

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**“CARACTERIZACION MOLECULAR Y  
EVALUACION DE LA CAPACIDAD  
DEGRADATIVA DE LA ATRAZINA POR  
BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS”**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo**

**AUTOR**

**Wilmer Miguel Abel Cervantes Sánchez**

**ASESOR**

**Pablo Ramírez Roca**

**Lima – Perú**

**2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 13:15 horas del 16 de julio de 2014, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de WILMER MIGUEL ABEL CERVANTES SÁNCHEZ.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 023-EAPGB-2014, el titulando expuso su tesis: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE LA ATRAZINA POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 12, calificativo: .....SABRERAMENTE.....

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo a WILMER MIGUEL ABEL CERVANTES SÁNCHEZ y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 14:30 horas se levantó la sesión.

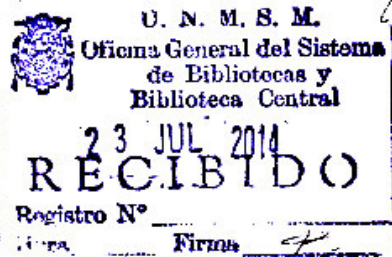
Ciudad Universitaria, 16 de julio de 2014.

Mg. ENRIQUE ESCOBAR GUZMAN  
(PRESIDENTE)

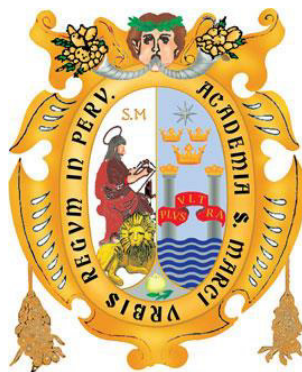
Dr. PABLO RAMÍREZ ROCA  
(ASESOR)

Mg. DEBORA ALVARADO IPARRAGUIRRE  
(MIEMBRO)

Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL  
(MIEMBRO)



falta CD



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(*Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA*)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA  
CAPACIDAD DEGRADATIVA DE LA ATRAZINA POR  
BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS”**

**Tesis para optar al Título Profesional de  
Biólogo Genetista Biotecnólogo**

**Bach. Wilmer Miguel Abel Cervantes Sánchez**

**ASESOR: Dr. Pablo Ramírez Roca**

**Lima - Perú**

**2014**

### **DEDICATORIA**

A mi madre que siempre estuvo a mi lado, en los mejores y peores momentos de mi vida, recordando la presencia de Dios y mi familia.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Se agradece a la Facultad de Ciencias Biológicas de la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos** por el financiamiento brindado a la presente investigación.

Agradecimientos especiales al Profesor Asesor, Dr. Pablo Ramírez Roca por el apoyo y asesoramiento realizado.

Al Jurado Revisor de Tesis: Mg. Enrique Escobar, Mg. Fernando Merino, Mg. Débora Alvarado por sus orientaciones y aportes brindados a la presente tesis.

También se agradece al equipo científico del **Instituto de Ciencias e Investigación Runa Perú (ICIR PERÚ)**, por su respaldo y apoyo brindado en la culminación de la presente tesis.

A personas muy especiales que me apoyaron en la culminación de la presente investigación como es mi madre Prof. Elena Sánchez, Licenciada Mónica Poma, Mi padre Lic. Gotardo Cervantes, Mi hermana Mg. Ruth Cervantes, Blgo. Luis Canales, Dr. Pedro Castellanos, Dra. Rosa Martínez, Mg Ruth García De La Guarda, Bach. Américo Torres, estudiantes César Lapa, Fabián Avilés, y a los demás integrantes de la Organización Fraternidad Científica Vida (FC-Vida) a quienes les tengo un gran aprecio por enseñarme el valor de la solidaridad y la verdadera amistad sin afanes mercantilistas.

## ABREVIATURAS

ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
CE	Conductividad Eléctrica
DL	Dosis letal
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Ethylendiamine tetra-aceti acid
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomas</i>
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MIC	Mínima concentración inhibitoria
MINAM	Ministerio del Ambiente
MS	Medio Mínimo de Souza
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
mM	Milimolar
NRDC	<i>National Resources Defense Council</i>

nt	Nucleótido
ng	Nanogramos
NIOSH	Instituto Nacional para la Salud y Seguridad en el Trabajo
nM	Nanomolar
pg	Picogramos
OD <sub>600</sub>	Densidad Óptica 600 nm DNA
OSHA	Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional
OSPAR	La Comisión de Oslo y Paris
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
rRNA 16S	Gen ribosomal 16S
rrn	Operón ribosómico
SINIA	Sistema Nacional de Información Ambiental
TSA	Agar tripticaso de soya
TSB	Caldo tripticaso de soya
UFC	Unidades Formadora de Colonias
UK EA	Agencia Ambiental del Reino Unido
μL	Microlitro
μM	Micromolar

WWF

El Fondo Mundial para la Naturaleza



# ÍNDICE GENERAL

Pág.

RESUMEN.....	i, ii
<i>ABSTRACT.....</i>	<i>iii, iv</i>
<b>I.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 EL PROBLEMA .....	4
<b>II.- MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
2.1 HERBICIDAS UTILIZADOS EN EL CULTIVO DEL MAÍZ.....	7
2.1.1 Generalidades. ....	7
2.1.2 Herbicidas triazínicos. ....	8
2.2 ATRAZINA .....	11
2.2.1 Características.....	11
2.2.3 Impacto en el ambiente y la salud.....	15
2.3 TRATAMIENTO PARA LA REMEDIACIÓN DE HERBICIDAS TRIAZÍNICOS. ....	17
2.3.1 Tratamiento fisicoquímico .....	17
2.4 BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA. ....	17
2.5 MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ATRAZINA .....	20
2.5.1 Método espectrofotométrico por UV.....	20
2.5.2 Método espectrofotómetro para ácido cianúrico.....	20
2.5.3 Método turbidimétrico para ácido cianúrico. ....	20
2.5.4 Método de cuantificación de atrazina en agua por inmunoensayo. ....	20
2.5.5 Método de cuantificación de atrazina con trazador radiactivo. ....	21

	Pág.
<b>III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. ....</b>	<b>23</b>
3.1 HIPÓTESIS. ....	23
3.2 OBJETIVOS .....	23
3.2.1 <i>Objetivo general</i> .....	23
3.2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	23
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 LOCALIZACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO .....	24
4.2 TOMA DE MUESTRA Y TRANSPORTE.....	25
4.3 SELECCIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS RESISTENTES A ATRAZINA. ....	26
4.4 EVALUACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS RESISTENTES A ATRAZINA. ....	26
4.4.1 <i>Cinética de aclaramiento en medio líquido MS.</i> .....	26
4.4.2 <i>Determinación de halos de degradación de los consorcios.</i> .....	27
4.4.3 <i>Cinética de crecimiento del consorcio MIG-AI que degrada atrazina.</i> .....	27
4.4.4 <i>Cinética de degradación de atrazina del consorcio MIG-AI.</i> .....	27
4.4.5 <i>Determinación de ácido cianúrico por espectrofotometría.</i> .....	28
4.4.6 <i>Conservación y mantención de los consorcios.</i> .....	28
4.5 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEL CONSORCIO SELECCIONADO.....	28
4.5.1 <i>Aislamiento de las cepas bacterianas por enriquecimiento selectivo.</i> .....	28
4.5.2 <i>Identificación macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.</i> .....	29
4.5.3 <i>Identificación bioquímica de las cepas aisladas.</i> .....	29
4.5.4 <i>Conservación de las cepas aisladas.</i> .....	29
4.6 BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA POR LAS CEPA BACTERIANA MIG-AI/2. ....	30
4.6.1 <i>Evaluación de la solubilización de la atrazina en medio líquido.</i> .....	30

	<b>Pág.</b>
4.6.2 Crecimiento en medio sólido revestido con atrazina. ....	30
4.6.3 Cinética de aclaramiento en medio líquido MS de la cepa MIG-AI/2. ....	30
4.6.4 Degradación de atrazina y formación de ácido cianúrico por MIG-AI/2. ....	31
4.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA MIG-AI/2. ....	31
4.7.1 Extracción y purificación del DNA genómico. ....	31
4.7.2 Amplificación del gen rRNA 16S. ....	31
4.7.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa. ....	32
4.7.4 Secuenciación del gen rRNA 16S. ....	32
4.7.5 Análisis molecular. ....	32
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
5.1. DETERMINACIÓN DEL PH DE LAS MUESTRAS DE SUELOS. ....	33
5.2 SELECCIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS RESISTENTES A ATRAZINA. ....	34
5.3 CINÉTICA DE ACLARAMIENTO DE LOS CONSORCIOS. ....	36
5.4 ÁREAS DE ACLARAMIENTO DE LOS CONSORCIOS EN MEDIO SÓLIDO. ....	37
5.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL CONSORCIO SELECCIONADO. ....	40
5.6 CUANTIFICACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA POR EL CONSORCIO MIG-AI. ..	41
5.7 EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ÁCIDO CIANÚRICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA. ....	43
5.8 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEL CONSORCIO SELECCIONADO. ....	44
5.9 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LAS CEPAS AISLADAS. ....	46
5.11 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS AISLADAS. ....	49
5.12 EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE ATRAZINA POR LAS CEPAS BACTERIANAS. ....	51
5.12.1 Evaluación por aclaramiento y biodegradación de atrazina. ....	51
5.12.2 Evaluación de la degradación de atrazina y presencia de ácido cianúrico. .	52
5.12.3 Extracción, amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S. ....	52

	<b>Pág.</b>
5.12.4 <i>Cepa identificada mediante análisis del gen rRNA 16S</i> .....	53
5.12.5 <i>Ensayos fenotípicos de la cepa identificada</i> .....	56
<b>VI.- DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
6.1. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA.....	57
6.2. EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE ATRAZINA POR CEPAS DEL CONSORCIO MIG-AI.	62
6.3. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS DEL CONSORCIO MIG-AI. ....	65
6.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA MIG-AI/2.....	67
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>69</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXO 01</b> .....	<b>79</b>
<b>ANEXO 02</b> .....	<b>80</b>
<b>ANEXO 03</b> .....	<b>82</b>
<b>ANEXO 04</b> .....	<b>83</b>
<b>ANEXO 05</b> .....	<b>84</b>
<b>ANEXO 06</b> .....	<b>85</b>
<b>ANEXO 07</b> .....	<b>86</b>
<b>ANEXO 08</b> .....	<b>87</b>

## 1. LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Herbicidas empleados en el cultivo del maíz	8
Tabla 2. Familia química de las s-triazinas	10
Tabla 3. Recomendaciones de uso de Gesaprim 90 WG	13
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del herbicida Gesaprim 90 WG	14
Tabla 5. Cepas bacterianas que mineraliza atrazina	18
Tabla 6. Porcentaje de reactividad de las s-triazinas	22
Tabla 7. Codificación de las muestras de acuerdo al muestreo	25
Tabla 8. pH de las muestras obtenido de un terreno agrícola	33
Tabla 9. Orden de degradación de los consorcios	34
Tabla 10. Absorbancias de la cinética de aclaramiento	37
Tabla 11. Áreas de aclaramientos de los consorcios	38
Tabla 12. Cinética de crecimiento del consorcio MIG-AI	40
Tabla 13. Cinética de degradación del consorcio MIG-AI	42
Tabla 14. Caracterización cultural de los aislados	48
Tabla 15. Fenotipificación de los aislados bacterianos en TSB	48
Tabla 16. Fenotipificación de los aislados bacterianos en TSA	49
Tabla 17. Pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos	50
Tabla 18. Detección de Ácido cianúrico por los aislados	52



## 1. LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de la atrazina	1
Figura 2. Estructura general de las S-triazinas	9
Figura 3. Lugar de procedencia de las muestras	24
Figura 4. Aclaramiento del medio líquido MS por los consorcios	35
Figura 5. Cinética de aclaramiento en medio líquido por los consorcios	37
Figura 6. Áreas de aclaramiento en medio sólido por los consorcios	39
Figura 7. Cinética de crecimiento y aclaramiento del consorcio MIG-AI	41
Figura 8. Cinética de degradación de atrazina por el consorcio MIG-AI	42
Figura 9. Cinética de formación de ácido cianúrico por el consorcio MIG-AI	43
Figura 10. Cinética de degradación, crecimiento y ácido cianúrico	44
Figura 11. Colonias del primer aislamiento MIG-AI/1, MIG-AI/2, MIG-AI/4G y MIG-AI/5	45
Figura 12. Colonias del segundo aislamiento MIG-AI/24A, MIG-AI/24C, MIG-AI/120A, MIG-AI/120B	46
Figura 13. Tinción Gram de las cepas aisladas del consorcio MIG-AI	47
Figura 14.. Aclaramiento en medio líquido MS de MIG-AI/2, MIG-AI/120B y MIG-24/C	51
Figura 15. Electroforesis de los amplificadores (rRNA 16S)	53
Figura 16. Resultado de Blast 2.0 de la cepa MIG-AI/2	54
Figura 17. Árbol filogenético de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MIG-AI/2	55





## RESUMEN

La atrazina es uno de los herbicidas más utilizados en el Perú; y el más usado en el mundo. Por su persistencia y su baja tasa de biodegradación en el medio ambiente es un contaminante de aguas superficiales y subterráneas. Ciertas investigaciones han demostrado que genera efectos tóxicos en algas, plantas acuáticas, insectos acuáticos, peces, anfibios y mamíferos; y ha sido clasificado como disruptor del sistema endocrino en humanos y animales. En la presente investigación se evaluó la capacidad de degradación de la atrazina, que se encuentra bajo la presentación comercial de Gesaprim 90 WG con un 90% de pureza, por consorcios microbianos aislados de suelos agrícolas, para lo cual se utilizó el medio de cultivo MS (De Souza *et al.*, 1998; Tafoya, 2008) con atrazina como única fuente de nitrógeno y de carbono. Para la obtención de los consorcios y la cepa bacteriana, se tomó 11 muestras de suelos de 50 gr, que fueron sembradas al 1% en 100 mL de medio líquido MS con 4 trasposos sucesivos de 7 días de intervalo. De los medios que presentaron aclaramiento fueron seleccionados consorcios para determinar la cinética de aclaramiento del medio líquido MS con atrazina a 100 mg/L, cultivado a 28°C, en agitación y; la cuantificación se realizó por espectrofotometría (600 nm). El consorcio MIG-AI generó un aclaramiento en 2 días, mientras que MIG-E, MIG-DI, MIG-AS en 3 días, los MIG-BS, MIG-F en 4 días, y MIG-G en 5 días. Estos resultados fueron corroborados con la formación de halos de biodegradación, al sembrar los consorcios, por moteado, en placas con MS cubierto con atrazina. Las áreas de aclaramiento surgieron para el consorcio MIG-G en 3 días, MIG-AI en 4 días, MIG-BS, DI, AS en 7 días, y MIG-E, MIG-F en 9 días. El consorcio MIG-AI fue seleccionado por su rápido aclaramiento y formación de halos de degradación. El consorcio MIG-AI presenta una fase exponencial entre las 0 y 48 horas en su cinética de crecimiento. Del primer aislamiento se obtuvo las cepas MIG-AI/1, MIG-AI/2, MIG-AI/4G y MIG-AI/5, y del segundo aislamiento se obtuvo las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/24C, MIG-AI/120A, MIG-AI/120B. Se extrajo DNA de la cepa MIG-AI/2 y se amplificó el gen rRNA 16S, que permitió obtener una identidad del 99% y similitud del 100% por BlastN 2.0 con las cepas *Stenotrophomonas maltophilia*. El consorcio MIG-AI presentó una velocidad específica de crecimiento de  $0.31 \text{ h}^{-1}$  a 100 mg/L de concentración de atrazina, alcanzando la fase exponencial entre 24 y 72 horas que coincide con la mayor actividad de degradación de la atrazina. La formación de ácido cianúrico presentó

una fase logarítmica entre las 48 y 96 horas, disminuyendo pasado las 120 horas. En conclusión, estos resultados demuestran la presencia de consorcios microbianos con capacidad eficiente para degradar atrazina, en suelos agrícolas de nuestro medio.

**Palabras Claves:** Atrazina, *Stenotrophomonas*, Ácido Cianúrico, Cinética de Biodegradación, Análisis Filogenético, 16S rRNA.

## **ABSTRACT**

*Atrazine is one of the most widely used herbicides in Peru; and the most used in the world. By persistence and low rate of biodegradation in the environment is a contaminant of ground surface waters. Research has shown that produces toxic effects on algae, aquatic plants, aquatic insects, fish, amphibians and mammals; and has been classified as endocrine disruptor in humans and animals. In the present study the ability of degradation of atrazine, which is under the commercial presentation of Gesaprim 90 WG with 90% pure by microbial consortia isolated from agricultural soils, for which the culture medium was used MS (Tafoya, 2008; De Souza et al., 1998) was evaluated with atrazine as the sole source of nitrogen and carbon. For consortia and Getting a bacterial strain, 11 samples of 50 g soil, which were seeded at 1% in 100 mL of liquid MS medium with 4 successive transfers 7 day interval was taken. Presenting media clearance consortia were selected to determine the kinetics of clearance of the MS liquid medium with atrazine to 100 mg / L, cultured at 28 ° C, and stirred; The quantitation was performed spectrophotometrically (600 nm). The MIG-AI consortium clearance in 2 days, while MIG-E, DI-MIG, MIG-AS in 3 days, the BS-MIG, MIG-F in 4 days, and MIG-G in 5 days. These results were corroborated with the formation of halos of biodegradation by sowing consortia for speckled with MS plates covered with atrazine. Clearance areas emerged for the MIG-G consortium in 3 days, MIG-AI in 4 days, MIG-BS, DI, AS in 7 days, and MIG-E, MIG-F in 9 days. The MIG-AI consortium was selected for its rapid clearance and degradation halos. The MIG-AI consortium presents an exponential phase between 0 and 48 hours in the growth kinetics. First isolation of the MIG-AI / 1, MIG-AI / 2, and MIG-AI MIG-AI/4G / 5 strains was obtained, and the second isolation MIG-AI/24A strains were obtained MIG-AI/24C, MIG-AI/120A, MIG-AI/120B. DNA was extracted from the MIG-AI / 2 strain and the 16S rRNA gene was amplified, which allowed for a 99% identity and 100% similarity BlastN 2.0 by *Stenotrophomonas maltophilia* strains. The MIG-AI consortium exhibited a specific growth rate of 0.31 h<sup>-1</sup> to 100 mg / L of atrazine concentration, reaching the exponential phase between 24 and 72 hours coinciding with the greatest activity of atrazine degradation. The formation of cyanuric acid showed a logarithmic phase between 48 and 96*

*hours, 120 hours passed decreasing. In conclusion, these results demonstrate the presence of efficient microbial consortia to degrade atrazine in agricultural soils of our country capacity.*

**Keywords:** *Atrazine, Biodegradation kinetics, Spectroscopy of UV, Phylogenetic analysis, 16S rRNA.*

## I.- INTRODUCCIÓN

Entre las muchas sustancias químicas utilizadas como herbicidas, se tiene la familia de las s-triazinas, siendo la atrazina una de las más difundidas y utilizadas en el mundo. La atrazina se usa en cultivos de caña de azúcar, maíz, sorgo, piña y en ciertos tipos de almendras y nueces. También se ha usado en silvicultura, en zonas con cultivos de pino y para prevenir el crecimiento de hierbas a lo largo de carreteras y líneas ferroviarias. El mecanismo de acción de este herbicida se inicia al ingresar a las plantas a través de sus raíces para luego acumularse en los tejidos de meristemos apicales y hojas. Su acción herbicida consiste en bloquear el transporte de electrones entre las plastoquinonas QA y QB durante la reacción de Hill en el fotosistema II, provocando la inhibición de la fotosíntesis de hidratos de carbono y la acumulación de dióxido de carbono dentro de la hoja, que deriva en el daño de estomas y en la inhibición de la transpiración (Tafoya, 2008). La atrazina no tiene acción sobre la germinación de las semillas, las plántulas lo absorben y es al cabo de unos días cuando aparece el efecto herbicida. El nombre científico de la atrazina según IUPAC es 2-cloro-4-etil amino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina, y su estructura química se encuentra representada en la figura 1.



Figura 1. Estructura química de la atrazina

Este herbicida presenta un gran número de nombres comerciales como Anatrastina 500 F, Atranex 50 SC, Atrastina 50 F, Atrastina 500 SC, Atrastina Nortox 500 SC, Atrastinax 500, Coyote, Gesaprim, Gesaprim 90 WG, Herbitrin 500 BR, Prosmil, Primoleo, Proof, Siptran 500 SC, Primaiz, Primestra, Controller, Extrazin, Herbimix, Primatop y Triamex (Davidson, 2005; Tafoya, 2008).

Uno de los principales impactos negativos en el medio ambiente de este herbicida, tiene que ver con su efecto de disruptor endocrino, lo cual altera el balance hormonal de los organismos, lo que puede conducir a defectos de nacimiento, anomalías sexuales y daños reproductivos. Todo ello es reconocido como tales por muchos organismos internacionales que velan por la salud y el medio ambiente, tales como: Agencia Ambiental del Reino Unido, Agencia Ambiental de Alemania, la Unión Europea, la Comisión Oslo y París (OSPAR), y el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF).

La atrastina es un compuesto que, pese a su elevada toxicidad y permanencia en el medio ambiente, es susceptible de ser biodegradado por bacterias del suelo (Tafoya, 2008). Se tiene entendido que a bajas concentraciones de plaguicidas, en el suelo, no afectan a la mayoría de poblaciones de grupos microbianos. Como es el caso de los herbicidas (Alexander, 1981), en el caso específico de atrastina se ha encontrado que la población bacteriana bajo condiciones aeróbicas lo emplean como fuente de carbono (C) y nitrógeno (N) (Radosevich *et al.*, 1995).

La ruta metabólica para la biodegradación de atrastina, puede variar de un organismo a otro. La cantidad y tipo del metabolito generado varía entre las diferentes rutas. La alta especificidad de las enzimas de las distintas bacterias como AtzA (o TrzN), AtzB y AtzC, les permite actuar sobre compuestos s-trazínicos específicamente, para metabolizarlos hasta ácido cianúrico el cual puede ser transformado por

numerosas enzimas de menor especificidad (Shapir *et al.*, 2007). La enzima AtzD actúa en conjunto con AtzE y AtzF para hidrolizar el ácido cianúrico, obteniéndose en total tres moles de dióxido de carbono y tres moles de amonio.

Muchas de las bacterias degradadoras de atrazina recientemente aisladas contienen TzrN en lugar de AtzA como la enzima responsable de la etapa inicial del metabolismo. Los sustratos sobre los que actúa la enzima AtzA son muy específicos, limitándose a las s-triazinas con grupo cloruro pero no fluoruro, por lo que las bacterias que poseen las enzimas AtzA, AtzB y AtzC son prácticamente incapaces de metabolizar herbicidas s-triazínicos no clorados (Seffernick *et al.*, 2002). Por otra parte, tanto estos herbicidas no clorados como la atrazina, pueden ser metabolizados por microorganismos que contengan las enzimas TzrN, AtzB y AtzC. Este hecho apoya la hipótesis de que, debido a su mayor poder catalítico de TzrN en comparación con AtzA, esta enzima se ha propagado más exitosamente entre los microorganismos ambientales (Tafoya, 2008).

Las distintas enzimas que participan en la ruta metabólica de la biodegradación de la atrazina, han sido identificadas en distintas cepas bacterianas tales como las Gram negativas: *Pseudomonas* sp. ADP, *Ralstonia brasiliensis* M91-3, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aminobacter aminovorans*, *Aminobacter ciceronei*, entre otros (Martínez *et al.*, 2001). Gram positivas: Como las cepas del género *Nocardioides* sp. SP12, *Arthrobacter aurescens* TC1, *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444 y *Arthrobacter crystallopoietes* (Mulbry, 1994; Topp *et al.*, 2000; Shapir *et al.*, 2005).

En el Perú, comercialmente, el uso de herbicidas triazínicos son bien solicitados y su uso está bien difundido. Sin embargo, no se han desarrollado monitoreos de control ambiental en relación a la atrazina, generando un desconocimiento sobre el nivel de contaminación de fuentes subterráneas de agua, ríos, lagunas, humedales, etc; de

igual manera hay pocas investigaciones en nuestro país sobre los plaguicidas y su efecto posible en la salud humana. Tampoco hay investigación sobre su biodegradación y posibles soluciones. En este sentido, esta tesis contribuirá en el conocimiento de la biodegradabilidad de la atrazina por microorganismos de suelos en nuestro país.

## **1.1 EL PROBLEMA**

La atrazina presenta una molécula heterocíclica que es característica en la familia de los s-triazínicos, que por su naturaleza química le permite tener una alta persistencia ambiental, por encima de los 260 días; esta característica también se debe a la naturaleza química, física y textura del suelo. La atrazina también puede ser degradado por acción química o física como por la luz; la degradación física-química es mínima comparado a la degradación por microorganismos de suelos. La difícil degradación de la atrazina, sumado a los suelos sobreexplotados por la agricultura, y a su poca solubilidad en agua, convierte a esta molécula en un xenobiótico con alto poder de contaminación ambiental. Por otra parte, se considera que la retención de la atrazina a la matriz del suelo, es un mecanismo que puede provocar una reducción de su mineralización (Blumhorst y Weber, 1994). Los estudios de Shapir *et al.* (2000), confirman esta relación inversa entre retención y mineralización, que se basa en que las bacterias atacan sustratos solubles, de modo que cualquier proceso que reduzca la accesibilidad, reduce la mineralización.

Los s-triazínicos son herbicidas que por su naturaleza química pueden escurrirse y filtrarse por los suelos adquiriendo una gran movilidad que les permite alcanzar depósitos y corriente de agua subterránea. Motivo por el cual se ha detectado la presencia de trazas de triazina en agua potable en muchos países, obligando a sus



autoridades, organismos no gubernamentales y organismos gubernamentales a tomar medidas y políticas que permiten un mejor control. El Perú tiene cultivos de maíz, caña de azúcar entre otros que utilizan atrazina como herbicida pre y postemergente, a lo largo de la costa centro y norte del país cuyos riegos son favorecidos por los ríos de la cuenca hidrográfica del pacífico, pozos, corrientes subterráneas como la capa freática. Esta disposición geográfica sumado a la movilidad de la atrazina aumenta los riesgos de una probable contaminación de mayor distribución. La movilidad de este herbicida se ve afectada por la presencia de materia orgánica en los suelos y la fracción inorgánica como es la arcilla que aumentan la adsorción de los suelos. Sin embargo el deterioro de los suelos por el uso excesivo de fertilizantes químicos y monocultivos han empobrecido estos terrenos favoreciendo la movilidad de este químico (Hang y Sereno, 2002; Gonzáles-Marquéz y *Hansen.*, 2009).

La atrazina tiene un impacto negativo en el medio ambiente al reducir las poblaciones producto de la desmasculinización de algunos peces y anfibios. También su efecto herbicida permite eliminar todo tipo de vegetación nativa y algas. Todo esto sumado a su capacidad de ser disruptor hormonal en humanos clasificado por la EPA, lo convierte en una necesidad prioritaria de encaminar esfuerzos para impulsar la investigación que procuren herramientas biotecnológicas para aminorar los impactos negativos de este compuesto químico (Hayes *et al.*, 2010; Loprieno *et al.*, 1980).

En nuestro país, no se ha aislado microorganismos con capacidad de biorremediación de herbicidas s-triazínicos; sin embargo el uso de estos herbicidas datan desde la década de los 70, y se desconoce el grado de contaminación por la ausencia de monitoreos a corrientes o depósito de agua subterránea y agua potable en zonas aledañas al uso de estos químicos. Estos microorganismos se encuentran habitando en suelos agrícolas por décadas de tratamiento de herbicidas s-triazínicos, que les ha permitido desarrollar la capacidad para degradar dicho compuesto químico,

y utilizarlo como única fuente de carbono y nitrógeno. Es poco frecuente que una sola especie de microorganismos domine y degrade este compuesto en suelos, por lo que la degradación es generalmente producto de la evolución en el tiempo y en el espacio, de la abundancia y actividad, de distintos tipos de microorganismos.

## **II.- MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Herbicidas utilizados en el cultivo del maíz.**

#### **2.1.1 Generalidades.**

El maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas. Este cereal es una especie que presenta gran cantidad de variedades, que suelen clasificarse atendiendo a la duración de su ciclo vegetativo (Martínez *et al.*, 1996). En el Perú hay una gran diversidad y amplia distribución de las razas de maíz cultivadas en las 24 regiones siendo el maíz gigante del Cuzco y el maíz morado los que más se exportan, esta amplia distribución del cultivo permite aproximar la distribución del uso de herbicidas triazínicos en nuestro país que carece de un monitoreo (Anexo 3).

Para la siembra del maíz es necesaria una temperatura media del suelo de 10°C, y para su crecimiento son necesarias temperaturas entre 24°C y 30°C. Además requiere unas elevados volúmenes de agua, así el maíz es un cultivo propio de los valles o de los climas tropicales húmedos de la costa centro y norte del Perú. La gran variedad de climas y pisos altitudinales de nuestro país, le permiten una amplia distribución geográfica. Se adapta a muy diferentes suelos, generalmente con un pH comprendido entre 6 y 7.

En siembras tempranas, cuando el desarrollo del maíz es lento en su principio, porque las temperaturas no son elevadas, la competitividad de las malas hierbas es mayor que en situaciones más cálidas. En cuanto a la reducción cuantitativa del rendimiento debido a las malas hierbas, existe numerosa información que indica que esta reducción es importante. Por ejemplo en el valle del Ebro se realizó un estudio comparativo en una zona poco infestada, 25 plantas por metro cuadrado de malas hierbas, y se comprobó que un tratamiento preemergencia, con una gran variedad de herbicidas como se aprecia en la Tabla 1, aumentaba el rendimiento de la cosecha en un 14% (Martínez *et al.*, 1996).

**Tabla 1.** Herbicidas empleados en el control de las malas hierbas del maíz (Martínez *et al.*, 1996).

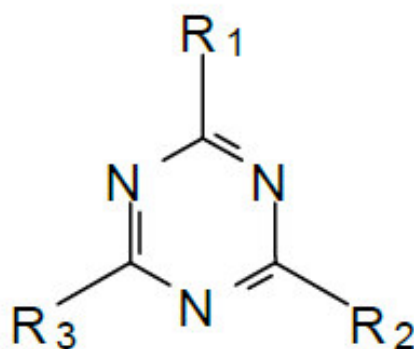
<b>Alacloro</b>	<b>Dimetenamida</b>	<b>Metolacoloro + atrazina</b>
<b>Alacloro + atrazina</b>	<b>Dimetenamida + atrazina</b>	<b>Metolacoloro + prometrina</b>
<b>Alacloro + linurón</b>	<b>EPTC + atrazina + AD</b>	<b>Nicosulfurón</b>
<b>Ametrina</b>	<b>EPTC + atrazina + dialamida</b>	<b>Paraquat</b>
<b>Atrazina</b>	<b>Etalfluralina</b>	<b>Pendimetalina</b>
<b>Atrazina + simazina</b>	<b>Fluroxipir</b>	<b>Pendimetalina + linurón</b>
<b>Bentazona</b>	<b>Linurón</b>	<b>Piridato</b>
<b>Bentazona + atrazina</b>	<b>MCPA</b>	<b>Piridato + atrazina</b>
<b>Bromoxinil</b>	<b>Mecoprop</b>	<b>Rimsulfurón</b>
<b>Butralina</b>	<b>Mecoprop-p</b>	<b>Simazina</b>
<b>Cianazina</b>	<b>Metobromurón</b>	<b>Sulcotriona</b>
<b>Cianazina + atrazina</b>	<b>Metolacoloro</b>	<b>Terbutrina + atrazina</b>
		<b>Vermolato + dialamida</b>

### 2.1.2 Herbicidas triazínicos.

Las triazinas son compuestos heterocíclicos nitrogenados con una alta persistencia al ser degradado en la naturaleza, y la mayoría de ellas son moléculas simétricas usadas para el control de hierbas dañinas, debido a su capacidad de inhibir la fotosíntesis. Estos compuestos químicos son un grupo de herbicidas químicos registrados e introducidos en 1954 como herbicidas, y son sustancias ampliamente utilizadas en todo el mundo (Figura 2 y Tabla 2). El primer producto ensayado fue la clorazina, utilizada en la destrucción de la vegetación espontánea que crecía en los cultivos de algodón, tomate, maíz, cebollas y patatas. Posteriormente fueron introducidas otras triazinas como la simazina, atrazina, propazina y la prometrina, que

se caracterizan por ser selectivas y a diferencia de los derivados de fenoxiácidos y carbamatos, no dañan la germinación de semillas (Radosevich *et al.*, 1995).

El anillo heterocíclico de *s*-triazina, se encuentra como constituyente de herbicidas, colorantes y explosivos (Seffernick *et al.*, 2002). La estabilidad de las *s*-triazinas se puede explicar por la configuración electrónica del anillo heterocíclico parecida a la del benceno.



**Figura 2.** Estructura general de las *s*-triazinas.

**Tabla 2.** Grupos funcionales, fórmulas químicas, y abreviaciones para atrazina y otros derivados s-triazinas (Radosevich *et al.*, 1995).

Grupo funcional			Nombre químico	Nombre común *
R1	R2	R3		
Cl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NH	2-Cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina (CIET)	Atrazina
Cl	NH <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NH	2-Cloro-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina (CIAT)	Dietilatrazina
Cl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NH	NH <sub>2</sub>	2-Cloro-4-etilamino-6-amino-s-triazina (CEAT)	Diisoprilatrazina
Cl	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	2-Cloro-4,6-diamino-s-triazina (CAAT)	Dietilisopropilatrazina
Cl	OH	NH <sub>2</sub>	2-Cloro-4-hidroxi-6-amino-s-triazina (CAOT)	NA
Cl	OH	OH	2-Cloro-4-dihidroxi -s-triazina (COOT)	NA
OH	OH	NH <sub>2</sub>	2,4-dihidroxi -6-amino-s-triazina (OAOT)	NA
OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NH	2-Hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina (OIET)	Hidroxiatrazina
OH	NH <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NH	2-Hidroxi-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina (OIAT)	Deetilhidroxiatrazina
OH	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	2-Hidroxi-4,6-diamino-s-triazina (OAAT)	Amelina
NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	2,4,6-Triamino -s-triazina (AAAT)	Melamina
OH	OH	OH	2,4,6-TriHidroxi-s-triazina (OIAT)	Ácido cianúrico

\* NA, no aplicable

## **2.2 Atrazina**

### **2.2.1 Características**

La atrazina fue patentada por primera vez en 1958, y desde entonces ha sido ampliamente utilizada como un efectivo herbicida para controlar o evitar el crecimiento de malezas en cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar, entre otros; así como las plantaciones de pinos, en áreas reforestadas y a lo largo de carreteras o vías de ferrocarril como en EEUU y Europa.

La atrazina es un compuesto cíclico heterogéneo, y pertenece a la familia de las s – triazinas. Ingresa a la planta a través de las raíces para acumularse en los meristemos apicales y las hojas, bloqueando la transferencia de electrones entre las plastoquinonas QA y QB durante la reacción de Hill, provocando la inhibición de la fotosíntesis de hidratos de carbono y la acumulación del dióxido de carbono en las hojas, que deriva en el daño de estomas y en la inhibición de la transpiración (Tafoya, 2008). Es uno de los herbicidas más usados en EEUU, la región de América Central y el Caribe (Davidson, 2005).

Más del 40% de la producción y consumo a nivel mundial de los plaguicidas corresponde a los herbicidas, y sólo en EEUU, que es el mayor consumidor de plaguicidas, el 70% de los plaguicidas utilizados son herbicidas. Estados Unidos es el mayor consumidor de atrazina a nivel mundial. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) estimó que entre 31 y 35 millones de kilogramos de atrazina fueron empleados en cultivos agrícolas de ese país en los años de 1987, 1993 y 1995 (IARC, 1999). En América del Sur y Centro América el uso de la atrazina va en aumento, y es uno de las regiones que más importan y formulan, después de EEUU. La comercialización de la atrazina ha llegado a más de 80 países. En el Perú, el uso de este herbicida se ha incrementado en cultivos de caña de azúcar, maíz, palmera aceitera y otros cultivos, siendo su mayor uso en la costa, en donde la

agricultura se encuentra más desarrollada y tecnificada que en la selva y la sierra. En el Perú se han registrado 23 productos comerciales de herbicidas que presentan atrazina como principio activo, con tres tipos de formulaciones y acabado final como: polvo mojable, suspensión concentrada y gránulos dispersables (Anexo 05 y Tabla 4). Estos productos son importados para utilizarlos principalmente en cultivos de sorgo, maíz y caña de azúcar. Dentro de esta gama de productos, el Gesaprim 90 WG es la formulación que tiene el más alto porcentaje de principio activo de atrazina (90%), en el mercado peruano, y se usa para combatir a *Cenchrus echinatus*, *Euphorbia* sp, *Portulaca oleracea*, *Eleusine indica*, *Datura stramonium*, *Amaranthus dubius*, *A. viridis*, *A. spinosus* (Tabla 3). Además, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) lo registra como ligeramente tóxico, y es importado por la empresa *Syngenta Crop Protection* S.A. sucursal del Perú.

Gesaprim 90 WG ejerce una buena acción herbicida en pre-emergencia y en post-emergencia temprana de las malezas, esto es, desde la emergencia hasta cuando alcancen un desarrollo máximo de 5 – 10 cm de altura. Malezas más desarrolladas habrán ya perjudicado el cultivo y/o requerirán dosis más elevadas (ATSDR, 2003).



**Tabla 3.** Recomendaciones de uso de Gesaprim 90 WG para los cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar (ATSDR, 2003).

Cultivo	Malezas	Dosis (Kg/Ha)
Maíz	Chamico ( <i>Datura stramonium</i> )  Yuyo ( <i>Amaranthus spp.</i> )	1 - 2
Sorgo	Pata de gallina ( <i>Eleusine indica</i> )  Verdolaga ( <i>Portulaca oleracea</i> )	1 - 2
Caña de Azúcar	Cadillo ( <i>Cenchrus echinatus</i> )  Lechera ( <i>Euphorbia spp.</i> )	2

**Tabla 4.** Propiedades físico-químicas del herbicida Gesaprim 90 WG que contiene 90% de atrazina (ATSDR, 2003).

PROPIEDAD	CARACTERÍSTICAS
Aspecto	Gránulos.
Color	Gránulos beige a café, grisáceos; olor débil y suave, levemente dulce.
Estado físico	Sólido
Punto de inflamación	No aplicable, dada la naturaleza de la formulación
Inflamación	Prácticamente no inflamable (1.2%)
Propiedades oxidantes	No oxidante
Propiedades explosivas	No es explosivo
Sensibilidad a la Fricción	No es sensible a la fricción
Sensibilidad al Shock	No es sensible al shock
Descomposición espontánea	Puede ser excluida, de acuerdo a la naturaleza de la descomposición térmica (20°C)
Densidad aparente	0.40 -0.45 gr/cm <sup>3</sup>
Viscosidad	No aplicable, dada la naturaleza de la formulación
Valor de pH	6-10 (1% en agua destilada)
Tensión superficial	34.2 mN/m (35 g/l en agua destilada a 20°C) 50.5 Mn/m (1 g/l en agua destilada a 20°C)
Solubilidad/Miscibilidad en agua	Miscible en agua.

### 2.2.3 Impacto en el ambiente y la salud.

La atrazina ha sido clasificada como un pesticida de uso restringido en Estados Unidos, debido a su potencial para contaminar aguas subterráneas. La EPA ha establecido un límite recomendado de hasta 3 microgramos por litro en agua proveniente de capas freáticas que se utilicen para el consumo humano (*Economic Commission for Europe*, 1992).

Estudios epidemiológicos relacionan el incremento de la exposición a cuatro plaguicidas frecuentemente usados (atrazina, 2,4-D, glifosato y diazinon) con un incremento en el riesgo de contraer cáncer (no-Hodgkin linfoma, de ovario, cáncer de pecho, cáncer cerebral y leucemia) (Sexena y Mani., 1985). Este herbicida ha sido clasificado dentro del Grupo C, que son considerados como posibles carcinógenos en humanos (Loprieno *et al.*, 1980). Esta clasificación fue confirmada por Birardar y Rayburn en 1995 al observarse daños en el cromosoma en las células del ovario del hámster chino, expuestas a 0.005 a 0.080  $\mu\text{M}$  de atrazina durante dos días (Ralebitso *et al.*, 2002). Los estudios en seres humanos indican que puede haber una conexión entre el uso de atrazina y ciertos tipos de cáncer, pero la información no ha sido suficientemente específica para establecer una conexión definitiva entre atrazina y cáncer. Otros estudios adicionales en animales no encontraron aumentos en tasas de cáncer asociados con atrazina. Basado en evidencia en animales, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha determinado que la atrazina no es clasificable en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos (ATSDR, 2003). Para proteger a los trabajadores de la posibilidad de que la atrazina produzca cáncer, distintos organismos como La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) e Instituto Nacional para la Salud y Seguridad en el Trabajo (NIOSH) han establecido un límite de 5 mg de atrazina por metro cúbico de aire en el ambiente de trabajo durante una jornada de 8 y 10 horas diarias. La Agencia para la Protección Ambiental (EPA) recomienda una cantidad máxima de atrazina en el agua potable de 3

µg/L y en los alimentos varía entre 0.02 y 15 partes de atrazina por millón de partes de alimentos (ATSDR, 2003).

La atrazina, ha sido identificada como disruptor endocrino, por muchas organizaciones entre ellas la Agencia Ambiental del Reino Unido (UK EA) como el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF), que lo incluye en la lista de plaguicidas reportados con efectos de disruptor endocrino (Anexo 4). Los disruptores endocrinos tienen efectos aún en concentraciones tan bajas como partes por trillón, por esta razón las evaluaciones de riesgos calculadas a partir de la extrapolación de dosis altas para identificar dosis seguras no son confiables (Bejarano, 2002). Estudios desarrollados en ranas determinaron que bajas concentraciones de atrazina logran alterar la diferenciación gonadal y la metamorfosis en el desarrollo del anfibio (Langlois *et al.*, 2010).

Con respecto a su persistencia en el ambiente, se ha reportado que la atrazina es movilizada desde el suelo hacia arroyos u otros cuerpos de agua y que permanece por mucho tiempo debido a su degradación lenta. También se acumulará y persistirá por tiempo prolongado en el agua subterránea. Éste es uno de los motivos por el cual se encuentra frecuentemente en muestras de agua tomadas en pozos de agua potable de ciertas regiones agrícolas. Su degradación es mucho más lenta que otros herbicidas triazínicos, debido a que su estructura simétrica le confiere tal propiedad. Este herbicida presenta una vida media de 60 a 100 días y junto al glifosato y flufosinato son los herbicidas de alto riesgo. La atrazina por las características ya mencionadas, ha sido clasificada como un pesticida de uso restringido en Estados Unidos, debido a su potencial para contaminar aguas subterráneas. En Europa por sus efectos ambientales y en cumplimiento de las normas rigurosas de la Unión Europea sobre el agua potable, ha sido prohibido en Italia, Alemania, Suecia, Países Bajos, Austria,

Hungría y severamente restringida en el Reino Unido (La lista de Lista, 2009; RAPAL, 2009).

A pesar de que numerosos estudios han demostrado los efectos dañinos de la atrazina sobre la salud humana y en el ambiente, la EPA, ha decidido no restringir aún el uso de esta sustancia (NRDC, 2003) y la considera en un proceso de Revisión Especial que ya data desde 1994.

## **2.3 Tratamiento para la remediación de herbicidas triazínicos.**

### **2.3.1 Tratamiento fisicoquímico**

El uso de estos métodos se fundamenta debido a que los anillos de las *s*-triazinas presentan electrones  $n$  que se tienden a localizar cerca de los átomos de nitrógeno. De esta manera, los átomos del anillo son susceptibles a un ataque nucleófilo debido a que son deficientes en electrones. Esto indica que la oxidación puede ser un buen método de tratamiento, debido a ello se utiliza ozono y peróxido (Hessel *et al.*, 1993)

Muchos herbicidas absorben luz en el rango espectral UV y pueden ser por lo tanto degradados a través de la acción de la luz UV (Frimmel, 1992). Especialmente el uso de procesos combinados entre luz UV con oxidantes clásicos ( $O_3$ ,  $H_2O_2$ ) para eliminar sustancias tóxicas durante el tratamiento del agua viene mostrando resultados muy promisorios (Glaze *et al.*, 1987; Hessel *et al.*, 1993).

## **2.4 Biodegradación de atrazina.**

Se han reportado investigaciones sobre la biodegradación de la atrazina por aislados bacteriano como *Pseudomonas* sp. (Mandelbaum *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 2001), *Rhodococcus rhodochrous* (Jones *et al.*, 1998), *Acinetobacter* spp. (Singh *et al.*, 2004), *Aerobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Deinococcus* sp. y *Delftia acidovorans*; así como consorcios de especies que incluyen

*Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas yanikuyae*, *Nocardia* sp., *Rhizobium* sp., *Flavobacterium oryzihabitans* y *Variovorax paradoxus* (Smith *et al.*, 2005) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Algunas cepas bacterianas que catabolizan atrazina (Tafoya, 2008; Relebitso-Senior *et al.*, 2002).

Cepa	Producto final	Mineralización
<i>Pseudomonas</i> sp.	Dietilatrastina +diisopropilatrastina	-
<i>Rhodococcus</i> sp. cepa B-30		-
<i>Pseudomonas</i> sp. cepa YAYA6	CO <sub>2</sub>	+
<i>Pseudomonas</i> sp. cepa ADP	CO <sub>2</sub> + NH	+
<i>Rhodococcus</i> sp. cepa N186/21	Hidroxiisopropilatrastina	-
<i>Ralstonia</i> M91-3	Biuret+CO <sub>2</sub> +NH	+
<i>Rhizobium</i> sp.	Hidroxiatrastina	-
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14A	CO <sub>2</sub>	+
<i>Clavibacter michiganese</i> ATZ1	Hidroxiatrastina+ N-etilamelida	-
<i>Pseudomonas</i> sp. Cepa CN1	Ácido cianúrico+ CO <sub>2</sub>	+
<i>Neocardioides</i> sp.	Hidroxiatrastina + N-etilamelida	-
<i>Pseudoaminobacter</i> sp.	CO <sub>2</sub>	+
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Da-16	Biuret+CO <sub>2</sub> +NH	+

El metabolismo de la atrazina se inicia con una reacción de hidrólisis en la que ocurre la deshalogenación del herbicida, produciéndose hidroxiatrazina. La alta especificidad de las enzimas AtzA (o TrzN), AtzB y AtzC, les permite actuar sobre compuestos s-trazínicos específicamente, para metabolizarlos hasta ácido cianúrico, el cual puede ser transformado por numerosas enzimas de menor especificidad (Shapir *et al.*, 2007). La enzima AtzD (cianúrico hidrolasa) ha mostrado tener actividad sobre ácido cianúrico y ácido N-metil isocianúrico (Fruchey *et al.*, 2003.) y su homóloga funcional la enzima TrzD sólo presenta actividad sobre el ácido cianúrico (Karns, 1999).

La enzima AtzD actúa en conjunto con AtzE y AtzF para hidrolizar el ácido cianúrico, obteniéndose un total de tres moles de dióxido de carbono y tres moles de amonio. Se reportó que *Pseudomonas* sp. ADP, aislada de suelos contaminados con atrazina, la mineralizó completamente hasta dióxido de carbono y amonio (Mandelbaum *et al.*, 1995). Esta mineralización mediada por *Pseudomonas* sp. ha sido muy estudiada, determinándose que este microorganismo posee seis genes (*atzA*, *atzB*, *atzC*, *atcD*, *atzF* y *atzF*) en el plásmido natural pADP-1 (Fíalo, 2004) y dichos genes codifican las enzimas involucradas en la mineralización del herbicida. La mineralización completa por *Pseudomonas* sp. ADP que porta el plásmido catabólico Padp-1, ya ha sido determinada (Martínez *et al.*, 2001) y los resultados obtenidos indican que el plásmido contiene 104 marcos de lectura abierta que intervienen en funciones como: catabolismo, transposición y mantenimiento, transferencia y replicación del plásmido (Davidson, 2005).

## **2.5 Métodos empleados para la cuantificación de atrazina**

### **2.5.1 Método espectrofotométrico por UV.**

La presencia de atrazina es cuantificada por espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 221 nm, previamente diluido y filtrado. Rangos menores a 40ppm es cuantificable. Es un método que presenta muchas limitaciones debido a ello se recomienda realizar la cuantificación por HPLC para una mayor precisión (Tafoya, 2008; Guevara-Almaraz, 2010).

### **2.5.2 Método espectrofotómetro para ácido cianúrico.**

La presencia de ácido cianúrico se cuantifica según el método estándar 8139, que se basa en la reacción del reactivo melanina con el anillo heterocíclico del ácido cianúrico que es cuantificado por espectrofotometría medido a 480nm de longitud de onda. El rango de detección es de 5 a 50 mg/L (HACH, 1989).

### **2.5.3 Método turbidimétrico para ácido cianúrico.**

El método turbidímetro deriva del método estándar 8139, que cuantifica la presencia de ácido cianúrico por la turbidez que genera en los medios al reaccionar el reactivo melanina con las moléculas del ácido cianúrico, que es detectado a 520-525 nm de longitud de onda. El rango de detección es de 7 a 55 mg/L (HACH, 1989).

### **2.5.4 Método de cuantificación de atrazina en agua por inmunoensayo.**

Se basa en el método 4670 validado por la EPA (2007), es un método que consiste en calcular el cambio de coloración en el tubo que contiene anticuerpos enzima-atrazina unidos a su superficie con perlas magnéticas; además contiene un cromóforo cuyo cambio en la coloración es detectada por espectrofotómetro a una longitud de onda de 660nm. La concentración de atrazina es inversamente proporcional a la absorbancia detectada (Schipper *et al.*, 1997) (Tabla 6).



#### **2.5.5 Método de cuantificación de atrazina con trazador radiactivo.**

Es un método utilizado para evaluar la biodegradación *in situ* de suelos y su capacidad de absorción. Este método consiste en la formulación de una molécula de atrazina cuyo anillo y/o moléculas de carbono son marcados con isótopos radiactivos de carbono ( $^{14}\text{C}$ ). Para la cuantificación de carbonos consumidos por los microorganismos se utiliza un equipo de centello líquido (LS 6500 Beckman Coulter), que cuantifica las emisiones de la radiación beta. La eficiencia del equipo es de 96.5% (González-Marquéz *et al.*, 2009).

**Tabla 6.** Porcentaje de reactividad de la atrazina en relación con otras moléculas triazínicas (EPA, 2007)

<b>Xenobióticos</b>	<b>Número de CAS</b>	<b>Porcentaje de Reactividad Relativo para atrazina</b>
Atrazina	1912-24-9	100
Ametrina	834-12-8	185
Prometrina	7287-19-6	113
Propazina	139-40-2	97
Prometon	1610-18-0	32
Di-etilado atrazina	6190-65-4	22
Simazina	122-34-9	15
Terbutrina	886-50-0	13
Terbutilazina	5915-41-3	5
Hidroxi atrazina	2163-68-0	0.5
Di-isopropilado atrazina	1007-28-9	0.3
Cianazina	21725-46-2	<0.1

### **III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

#### **3.1 Hipótesis.**

Existen consorcios de microorganismos de suelos agrícolas en nuestro medio, que tienen la capacidad de biodegradar compuestos cíclicos heterogéneos como la atrazina.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Objetivo general**

Caracterizar molecularmente y evaluar la capacidad de degradar la atrazina por bacterias aisladas de suelos agrícolas.

##### **3.2.2 Objetivos específicos**

1. Seleccionar consorcios bacterianos que utilizan atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno.
2. Determinar la cinética de crecimiento en atrazina de los consorcios de mejor rendimiento en biodegradar atrazina.
3. Determinar la cinética de degradación de la atrazina por métodos espectrofotométricos.
4. Determinar la relación filogenética de las cepas seleccionadas frente a secuencias disponibles en las bases de datos mediante el análisis de las secuencias del gen ribosomal 16S.

## IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Localización de la zona de muestreo

Las muestras fueron tierra provenientes del terreno de experimentación agrícola de la Unidad de Programa de Maíz de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicado en el distrito de La Molina del departamento de Lima, a 500 m.s.n.m. En este terreno experimental se tiene más de dos décadas aplicando fertilizantes, plaguicidas y herbicidas con especial énfasis en la familia de los s-triazínicos como la atrazina, por ser de mayor uso en el cultivo de maíz (Fig. 3).



**Figura 3.** Terreno agrícola de experimentación del Programa de Maíz de la UNALM y lugar de procedencia de las muestras del presente estudio, colectadas el marzo del 2012.

## 4.2 Toma de muestra y transporte

En todos los casos las muestras fueron colectadas en bolsas estériles y herméticas, tomadas en 8 puntos escogidos estratégicamente en el terreno muestreado de los cuáles se obtuvo 11 muestras de 50 gr y transportadas a temperatura ambiente (25°C) al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su posterior análisis.

Los 8 puntos de muestreo fueron codificados en orden alfabético A, B, C, D, E, F, G, H, a los que, dependiendo de la profundidad, se añadió la siguiente codificación: (S) para 10 cm; (CS) para 20 cm; (I) para 30 cm de la superficie. A todas las muestras se les determinó su pH y Conductividad Eléctrica empleando un pHmetro y conductímetro marca Hanna. El muestreo fue distribuido al azar y con una separación de 3 m de radio por campo muestreado (Tabla N°7).

**Tabla 7.** Datos codificados de las muestras realizadas en relación a su orden y profundidad

	<b>MUESTRA</b>	<b>PROFUNDIDAD</b>
<b>1</b>	<b>AI</b>	<b>30 cm</b>
<b>2</b>	<b>AS</b>	<b>10 cm</b>
<b>3</b>	<b>BS</b>	<b>10 cm</b>
<b>4</b>	<b>C</b>	<b>20 cm</b>
<b>5</b>	<b>DI</b>	<b>30 cm</b>
<b>6</b>	<b>DCS</b>	<b>20 cm</b>
<b>7</b>	<b>E</b>	<b>20 cm</b>
<b>8</b>	<b>F</b>	<b>20 cm</b>
<b>9</b>	<b>G</b>	<b>20 cm</b>
<b>10</b>	<b>HI</b>	<b>30 cm</b>
<b>11</b>	<b>HCS</b>	<b>10 cm</b>

### **4.3 Selección de consorcios microbianos resistentes a atrazina.**

Las muestras de suelo fueron pesadas y sembradas al 1% en medio mínimo MS de Souza *et al.*, (Anexo 1) con una concentración final de 100 mg/L del herbicida Gesaprim 90 WG, previamente lavado y decantado con solución salina, que es el herbicida con mayor concentración de atrazina en el mercado peruano, utilizado como única fuente de carbono y nitrógeno. El pH del medio fue ajustado a 6.5 con hidróxido de sodio (NaOH).

Las muestras fueron cultivadas en 100 mL de medio líquido MS por 15 días a temperatura ambiente en agitación constante a 180 rpm. Luego se traspasó 1 mL a nuevos medios MS manteniendo las mismas condiciones de cultivo. Este proceso fue desarrollado 4 veces, hasta observar el aclaramiento del medio, que fue medido por espectrofotometría a 600 nm.

### **4.4 Evaluación de consorcios microbianos resistentes a atrazina.**

#### **4.4.1 Cinética de aclaramiento en medio líquido MS.**

Los consorcios seleccionados fueron evaluados durante 6 días y ordenados de acuerdo a su capacidad de producir cambios en el medio por la desaparición de la turbidez producida por la atrazina, que fue medido de manera indirecta, cuantitativamente por espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda. De igual manera se comprobó la presencia de crecimiento de los consorcios. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que se detalló en 4.3.

#### **4.4.2 Determinación de halos de degradación de los consorcios.**

Esta metodología fue implementada al adicionar 1 mL de acetona con 10 g/L de atrazina diluida, sobre medio mínimo sólido MS con la mezcla de glucosa y sin glucosa, que al evaporarse el solvente, la atrazina reviste la superficie del medio base homogéneamente como un fino manto blanco. Los consorcios fueron reactivados por 72 horas, luego sembrados por moteado y por triplicado en medio sólido MS revestido con atrazina, e incubados a temperatura ambiente por 12 días. La presencia de áreas de aclaración y la aparición de colonias confirman la adaptabilidad de los consorcios de microorganismos a altas concentraciones de atrazina y su capacidad de degradación. Estos consorcios fueron corroborados con tinción Gram.

#### **4.4.3 Cinética de crecimiento del consorcio AI que degrada atrazina.**

El consorcio fue reactivado por 72 horas, luego se inoculó al 2% en medio MS con atrazina a 40 y 100 mg/L. El crecimiento de la población de bacterias fue determinado a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas, que fue debidamente diluido y sembrado por diseminación con 0.1 mL en medio TSA e incubado a temperatura ambiente por 48 horas.

#### **4.4.4 Cinética de degradación de atrazina del consorcio MIG AI.**

El consorcio fue reactivado por 72 horas, luego se inoculó al 2% en medio MS con atrazina a 100 mg/L y 40 mg/L e incubadas a temperatura ambiente con agitación constante a 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 1 mL a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas, que fueron debidamente diluidas, centrifugadas a 13000 rpm para luego evaluarlo por absorbancia a 221 nm de longitud de onda por espectrofotometría UV (Tafoya, 2008). Se trabajó sin y con el antimicótico ciclohexemide a una concentración final de 10 mg/L.

#### **4.4.5 Determinación de ácido cianúrico por espectrofotometría.**

El consorcio fue reactivado por 72 horas, luego se inoculó al 2% en medio MS con atrazina a 40 y 100 mg/L e incubadas a temperatura ambiente con agitación constante a 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 2 mL a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas, que fueron mezcladas centrifugadas a 5000 rpm y mezcladas con el reactivo melanina en relación de 2:1. Luego se midió la absorbancia por espectrofotometría a 480 nm de longitud de onda (Galíndez *et al.*, 2010; HACH, 1989).

#### **4.4.6 Conservación y mantención de los consorcios.**

Los consorcios seleccionados fueron reactivados en 100 mL de medio líquido MS a 100 mg/L de atrazina con 180 rpm a temperatura ambiente hasta el aclaramiento del medio para luego ser guardados en las mismas condiciones sin agitación, para su mantenimiento. Este proceso se desarrolló solo 3 veces hasta los 6 meses luego se renovó el medio al traspasarse 5 mL a medio de reciente preparación.

### **4.5 Aislamiento de bacterias del consorcio seleccionado**

#### **4.5.1 Aislamiento de las cepas bacterianas por enriquecimiento selectivo.**

A partir del consorcio seleccionado se realizaron 3 traspasos en las mismas condiciones de cultivo a 100 mg/L de atrazina en medio MS. Luego se tomó 1 mL del cultivo y fue diluido en una batería de solución salina fisiológica sembrándolo por diseminación 0.1 mL de cada diluyente en placas con medio TSA. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente por 48 horas.

Las colonias diferentes fueron resembradas en TSB por 24 horas y sembradas individualmente en placas TSA para estudios microbiológicos.



#### **4.5.2 Identificación macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.**

Las cepas aisladas fueron reactivadas en medio TSB por 24 horas, para ser sembradas en placas con medio TSA y medio sólido MS con 0.3% de glucosa como fuente de carbono y 1% de sulfato nítrico como fuente de nitrógeno. Se determinó en TSA y MS en medio sólido la forma, borde, elevación, pigmentación, textura, tamaño de las colonias, velocidad de crecimiento de las colonias seleccionadas, entre otros. En medio TSB se controló la velocidad de crecimiento, características culturales como presencia de película, sedimento, turbidez, y anillo de las colonias.

Tinción Gram se realizó tomando alícuotas de las cepas previamente reactivadas en TSB por 14 horas, para luego fijar la muestra en láminas por secado, adicionando una batería de reactivos con tiempos determinados en el siguiente orden: azul cristal violeta, 1 min; lugol, 1 min; alcohol acetona, 30 seg; y safranina, 1 min. Se determinó la morfología de las bacterias seleccionadas, el tipo de tinción de pared celular.

#### **4.5.3 Identificación bioquímica de las cepas aisladas.**

Se realizaron las pruebas de Oxidasa, Catalasa, Citrato, SIM ( $H_2S$ , Indol, Motilidad), LIA (Lisina, Hierro Agar), TSI (Triple Azúcar Hierro), para determinar el metabolismo de los microorganismos seleccionados. Finalmente identificar molecularmente y sembrar los microorganismos identificados en medios específicos como método confirmatorio y distintivo para los diferentes géneros (De Vos *et al.*, 2009; Brenner *et al.*, 2005; Camacho y Hernández, 2002).

#### **4.5.4 Conservación de las cepas aisladas.**

Se reactivaron las cepas bacterianas aisladas del consorcio MIG-AI, en medio TSB con atrazina a 20 mg/L, por 24 horas a temperatura ambiente, luego se traspasó 500  $\mu$ L del cultivo en tubos microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad en relación 1:1 con

glicerol. Fue conservado a -20°C. Paralelo a ello se sembraron en ceparios de TSA con atrazina a 20 mg/L.

#### **4.6 Biodegradación de la atrazina por las cepa bacteriana MIG AI 2.**

##### **4.6.1 Evaluación de la solubilización de la atrazina en medio líquido.**

La cepa MIG-AI/2 se reactivó en medio TSB por 24 horas. Luego fue lavada con solución salina al 0.89% de ClNa, y sembradas al 1% a 0.5 escala McFarland, en medio líquido MS con atrazina a 100 mg/L. La cepa fue evaluada durante 6 días y ordenadas de acuerdo a su capacidad de producir cambios en los medios por la desaparición de la turbidez producida por la atrazina, que fue medido cualitativamente al observarse un aclaramiento del medio, y cuantitativamente al evaluar por espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda.

##### **4.6.2 Crecimiento en medio sólido revestido con atrazina.**

Esta metodología fue implementada al adicionar 1 mL de acetona con 10 g/L de atrazina disuelta, sobre medio sólido MS que al evaporarse el solvente, la atrazina reviste homogéneamente la superficie como un manto blanco. La cepa bacteriana MIG AI 2 fue sembrada por moteado y por triplicado e incubadas a temperatura ambiente por 12 días. La presencia de colonias indica su resistencia y degradación en las primeras rutas metabólicas, pero la formación de halos de aclaramiento confirmaría su adaptabilidad a altas concentraciones de atrazina y su capacidad para degradarla.

##### **4.6.3 Cinética de aclaramiento en medio líquido MS de la cepa MIG-AI/2.**

La cepa bacteriana fue reactivada en medio TSB por 24 horas, luego centrifugada a 13000 rpm, el precipitado es resuspendido con solución salina a 0.89%, este procedimiento es repetido 2 veces. Luego se inoculó al 1% en medio MS con 100 mg/L

de atrazina. El aclaramiento fue evaluado cualitativamente por observación, y cuantitativamente por espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda durante 6 días.

#### **4.6.4 Degradación de atrazina y formación de ácido cianúrico por MIG-AI/2.**

El procedimiento de reactivación de la cepa MIG-AI/2 se especifica en 4.5.4. Luego se inoculó al 1% en medio MS con 100 mg/L de atrazina. La degradación de atrazina se evaluó por espectrometría UV a 221 nm y la presencia de ácido cianúrico mediante la reacción de la solución melamine con trazas de ácido cianúrico que surgen en los medios de cultivo, cuantificándose por espectrofotometría a 525 nm.

#### **4.7 Identificación molecular de la cepa MIG-AI/2.**

##### **4.7.1 Extracción y purificación del DNA genómico.**

La cepa nativa seleccionada del consorcio MIG-AI, se cultivó en medio TSB por 12, 18, 24 y 48 horas a temperatura ambiente. Para la extracción de DNA cromosómico se utilizó la metodología de *Wizard genomic DNA purification kit* (Promega®) (Orbegozo *et al.*, 2008).

##### **4.7.2 Amplificación del gen rRNA 16S.**

Se emplearon los iniciadores 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 536R (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'); el tamaño del producto de PCR esperado fue de 500 pb correspondiente al primer tramo del gen rRNA 16S (Abanto, 2008), y se siguió las indicaciones de la *KOD HOT start DNA polimerasa* (Novagen®) para la reacción de PCR, la cual consistió en: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, 33 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 62°C por 10 seg, amplificación a 70°C por 10 seg, y amplificación final a 70°C por 10 min.

#### **4.7.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Para visualizar el DNA cromosomal y los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 0.5X. Las muestras se mezclaron con solución de carga (0.25% azul de bromofenol, 40% sacarosa). Se empleó 70 voltios durante una hora para la corrida electroforética. Como marcadores de estándares de peso molecular se utilizó 1 kb plus *DNA Ladder* (Promega®). La tinción se realizó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

#### **4.7.4 Secuenciación del gen rRNA 16S.**

La secuenciación de los amplificados se realizó bajo las condiciones de BigDye™ terminator cycling y la corrida utilizando *Automatic Sequencer 3730xl* de la empresa *Macrogen Korea* (<http://www.macrogenusa.com>). Para ello se envió 50 µL de DNA por reacción y los iniciadores a una concentración de 20 pmol/µl (5 pmol/reacción).

#### **4.7.5 Análisis molecular.**

La secuencia consenso del gen rRNA 16S de la cepa seleccionada fue alineada con el programa ClustalX 2.0.12 (Thompson *et al.*, 1997). Luego, éstas fueron comparadas con la base de datos del GenBank/EMBL/DDBJ usando la plataforma del programa local de alineamiento de secuencias BlastN versión 2.0 (Altschul *et al.*, 1990). Seguido, se realizó un alineamiento múltiple con el programa Clustal W de Bioedit 7.0.9 (Hall *et al.*, 1999) con secuencias que presentaron similitud (Valor E) mayor o igual a 98%, además de secuencias de otras especies relacionadas obtenidas de la base de datos. Luego, los *gaps* fueron tratados con BioEdit 7.0.9 y finalmente se construyó el árbol filogenético con el programa Mega 5.0 (Kumar *et al.*, 2008) empleando el método de Neighbor-Joining con un modelo compuesto de Máxima Verosimilitud.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Determinación del pH de las muestras de suelos.

Los microorganismos degradadores de *s*-triazínicos, objeto de este estudio se aislaron de suelos que presentaron pH cercanos al neutro (Tabla 8).


**Tabla 8.** pH de las muestras de suelos

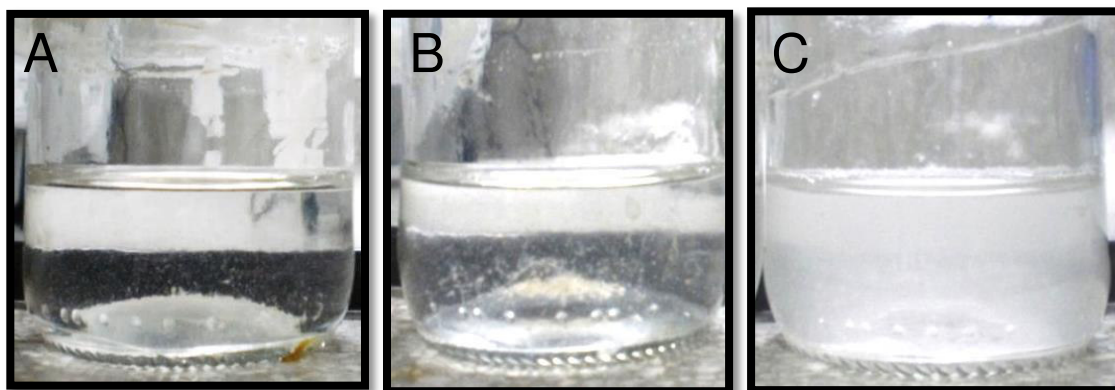
Número	Código	pH
1	AI	7.23
2	AS	7.42
3	BS	7.25
4	C	7.12
5	DI	6.97
6	DCS	6.98
7	E	7.05
8	F	7.34
9	G	7.26
10	HI	7.13
11	HCS	7.05
Promedio		7.16

## 5.2 Selección de consorcios microbianos resistentes a atrazina.

Los 7 consorcios aclaran los medios líquidos MS con atrazina a 100 mg/L, y se observa con desaparición de la turbidez y crecimiento bacteriano que fue corroborado por la precipitación de carga bacteriana a los 4 días en promedio, formando agregados, producto probablemente de la carencia de nutrientes de los microorganismos, que fue corroborado con tinción Gram. De las 10 muestras analizadas, solo 7 obtuvieron los resultados deseados (MIG-AI, BS, E, G, F, DI, AS), los 3 restantes MIG-DCS, MIG-HCS+HI y MIG-C mantuvieron la turbidez inicial después de 14 días de evaluación y fueron descartados. Después de 5 trasposos selectivos, suplementados con atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno se obtuvo el orden cualitativo de la degradación según el grado de aclaramiento del medio por el consorcio evaluado. Los consorcios MIG-AI y MIG-BS generaron buen rendimiento de aclaramiento en comparación con los otros consorcios (Tabla 9 y Fig.4).

**Tabla 9.** Consorcios ordenados por su capacidad de producir aclaramiento (biodegradación de atrazina) en los medios de cultivo

ORDEN DE ACLARAMIENTO		CONSORCIOS
1		MIG-AI
2		MIG-BS
3		MIG-E
4		MIG-G
5		MIG-F
6		MIG-DI
7		MIG-AS
8		MIG-DCS
9		MIG-HCS+HI
10		MIG-C



**Figura 4.** Se muestran los consorcios que mejor aclaran (degradan) la atrazina en medio MS a 100 mg/L. A) El consorcio MIG-AI muestra un mejor aclaramiento del medio MS, después de los 4 días de cultivo, en comparación a los otros consorcios. B) Consorcio MIG-BS; C) Control.

Se observó el aclaramiento total en los medios a partir de las 48 a 72 horas para los consorcios MIG-AI, MIG-BS, MIG-E, MIG-G, MIG-F, MIG-AS, y MIG-DI. Los otros 3 consorcios restantes MIG-DCS, MIG-C, MIG-HCS+HI, no mostraron aclaramiento alguno hasta después de los 20 días. En los consorcios que degradan se apreció aclaramiento, seguido de la presencia de pequeños conglomerados que probablemente fueron asociaciones de microorganismos (Fig. 4).

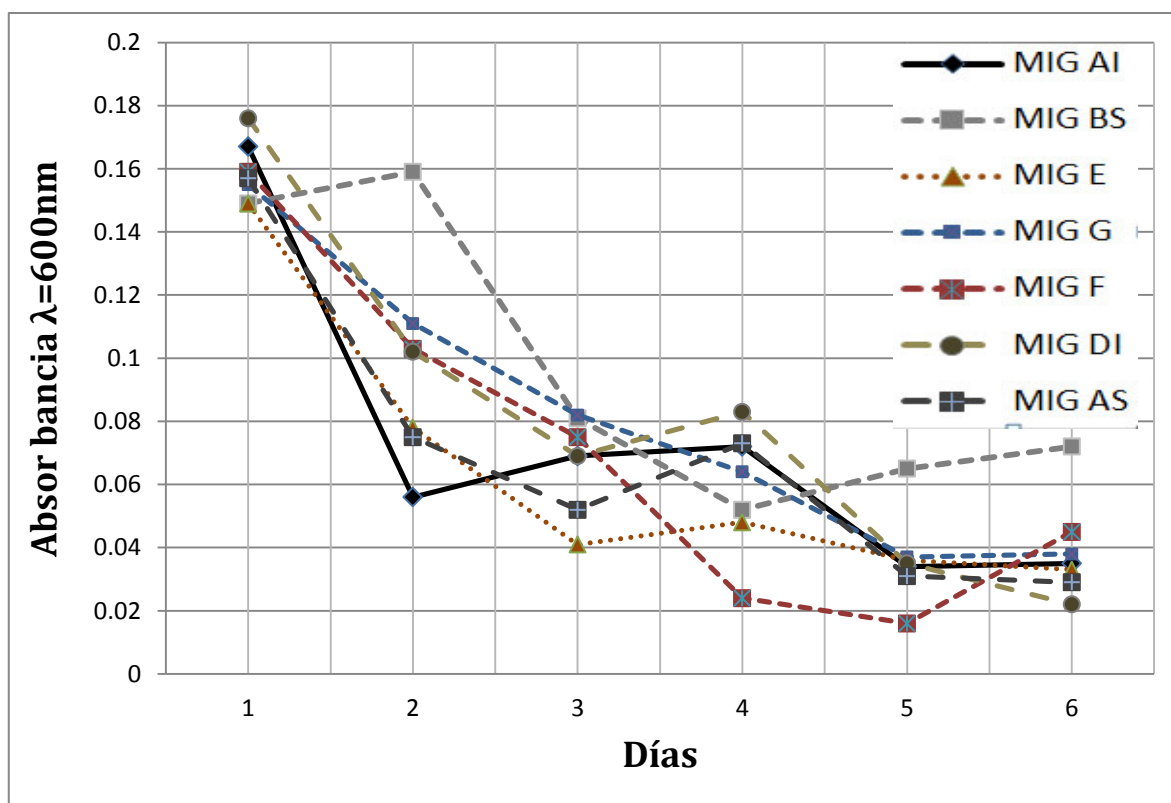
### 5.3 Cinética de aclaramiento de los consorcios.

La cinética de aclaramiento de los consorcios fue evaluado cuantitativamente durante 6 días. El consorcio MIG-AI manifestó un mejor rendimiento a las 48 horas, posteriormente generó un leve aumento de turbidez hasta el cuarto día, que se debe al crecimiento microbiano, para finalmente decaer al día 5 correspondiente, con el decaimiento de la población microbiana, producto de la escases de nutrientes. Los demás consorcios presentaron valores aclaramiento posterior a las 72 horas (Tabla 10 y Fig. 5).

**Tabla 10.** Cinética de aclaramiento de los consorcios, evaluadas por espectrofotometría con medición de absorbancias cada 24 horas a 600 nm de longitud de onda durante 6 días

CONSORCIOS	ABSORBANCIA/DÍA ( $\lambda=600\text{nm}$ )						
	0	1	2	3	4	5	6
<b>MIG-AI</b>	0.164	0.167	0.056	0.069	0.072	0.034	0.035
<b>MIG-BS</b>	0.158	0.149	0.159	0.081	0.052	0.065	0.072
<b>MIG-E</b>	0.153	0.149	0.078	0.041	0.048	0.036	0.033
<b>MIG-G</b>	0.161	0.155	0.111	0.082	0.064	0.037	0.038
<b>MIG-F</b>	0.162	0.159	0.103	0.075	0.024	0.016	0.045
<b>MIG-DI</b>	0.172	0.176	0.102	0.069	0.083	0.035	0.022
<b>MIG-AS</b>	0.164	0.157	0.075	0.052	0.073	0.031	0.029





**Figura 5.** Cinética de aclaramiento de los consorcios evaluados durante 6 días.

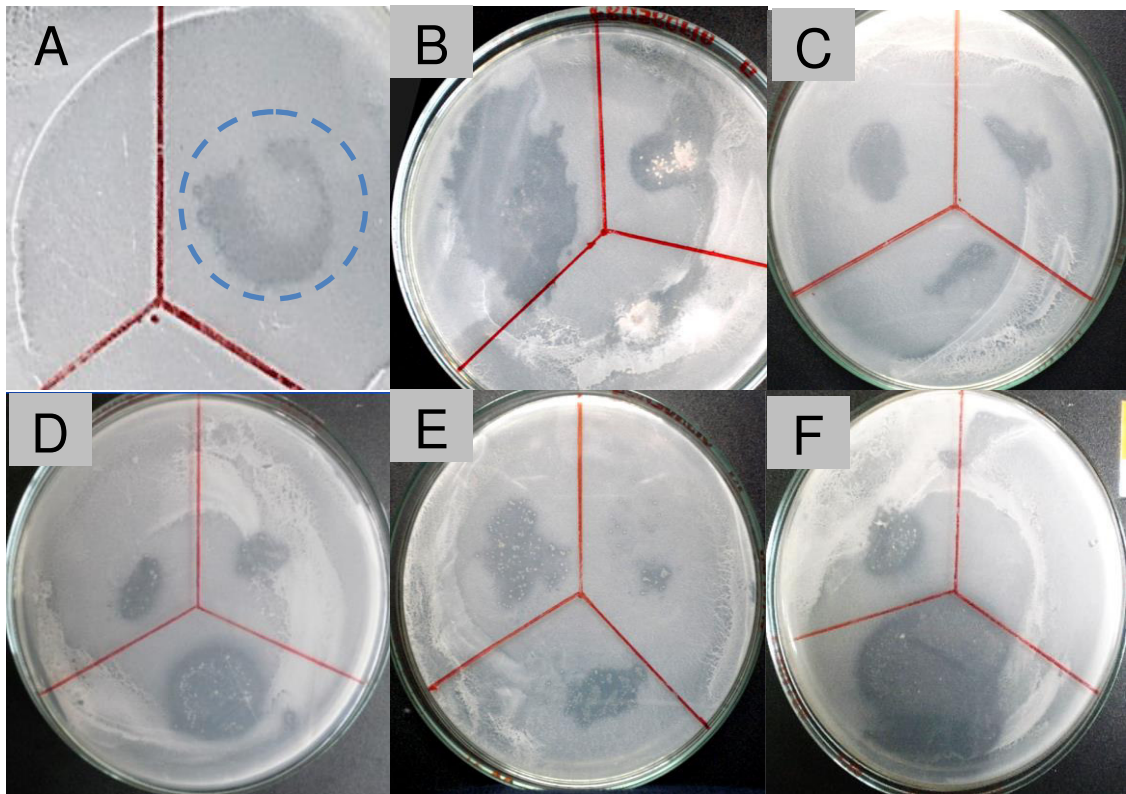
#### 5.4 Áreas de aclaramiento de los consorcios en medio sólido.

Los siete consorcios evaluados generaron áreas de aclaramiento consumiendo atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno, confirmando su capacidad de degradación y adaptabilidad a altas concentraciones. Los consorcios MIG-G y MIG-AI produjeron aclaramiento a los 4 y 5 días, con presencia de colonias bacterianas, que fue corroborado por tinción Gram (Tabla 11 y Fig. 6)

**Tabla 11.** Los siete consorcios generaron áreas de aclaramiento dentro de los 10 días de evaluación. Los consorcios fueron sembrados por moteado y por triplicado. El consorcio MIG-AI y MIG-G generaron un rápido aclaramiento dentro de los 4 a 5 días

		<b>ÁREAS DE ACLARAMIENTO POR DÍAS</b>									
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>CONSORCIOS</b>	<b>Repeticiones</b>										
<b>MIG-AI</b>	<b>1</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<b>2</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	<b>3</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>MIG-BS</b>	<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<b>2</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<b>3</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>MIG-E</b>	<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	<b>2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	<b>3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>MIG-G</b>	<b>1</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<b>2</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<b>3</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>MIG-F</b>	<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	<b>2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<b>3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>MIG-DI</b>	<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<b>2</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<b>3</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>MIG-AS</b>	<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<b>2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<b>3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): Presencia de áreas de aclaramiento en la superficie de los medios.



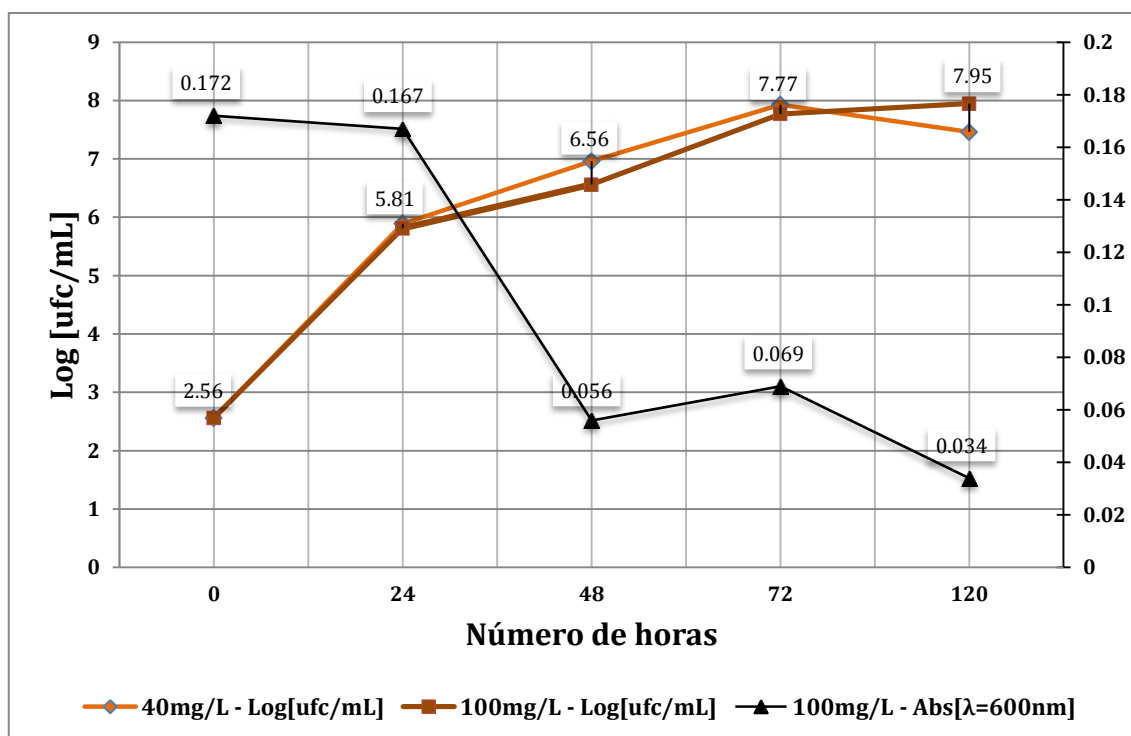
**Figura 6.** Áreas de aclaramiento en medio sólido MS revestido superficialmente con atrazina. A) Consorcio MIG-AI genera un área de aclaramiento a los 4 días. B) Consorcio MIG-G con áreas de aclaramiento a los 4 días. C) Consorcio MIG-E con áreas de aclaramiento a los 10 días. D) Consorcio MIG-F con áreas de aclaramiento y presencia de colonias de microorganismos, evaluado a los 10 días. E) Consorcio MIG-DI se aprecia aclaramiento a los 10 días. F) Consorcio MIG-AS con áreas de aclaramiento generadas a los 10 días.

### 5.5 Cinética de crecimiento del consorcio seleccionado.

El consorcio MIG AI en medio líquido MS a 100 mg/L de atrazina, crece exponencialmente dentro de las 48 horas con una velocidad de crecimiento de  $0.312 \text{ h}^{-1}$ , presentando una disminución de su velocidad de crecimiento entre las 48 y 120 horas, para finalmente entrar en fase de estacionaria después de las 120 horas. Cuando el consorcio MIG AI es evaluado en medio líquido MS a 40 mg/L de atrazina, crece exponencialmente dentro de las 48 horas a  $0.32 \text{ h}^{-1}$ , disminuyendo su velocidad de crecimiento entre las 24 y 72 horas, para finalmente entrar en fase de latencia a las 72 horas y fase de muerte entre las 72 y 120 horas por ausencia de nutrientes (Tabla 12 y fig. 7).

**Tabla 12.** Número de colonias contabilizadas a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas. El promedio y el logaritmo del número de colonias por mililitro de cultivo a 100 mg/L y 40 mg/L de concentración

N° Hrs	100 mg/L		40 mg/L	
	Promedio	Log[ufc/mL]	Promedio	Log[ufc/mL]
0	$36 \times 10^1$	2.56	$36 \times 10^1$	2.56
24	$65 \times 10^4$	5.81	$78 \times 10^4$	5.89
48	$36 \times 10^5$	6.56	$92 \times 10^5$	6.96
72	$60 \times 10^6$	7.77	$85 \times 10^6$	7.93
120	$90 \times 10^6$	7.95	$29 \times 10^6$	7.46



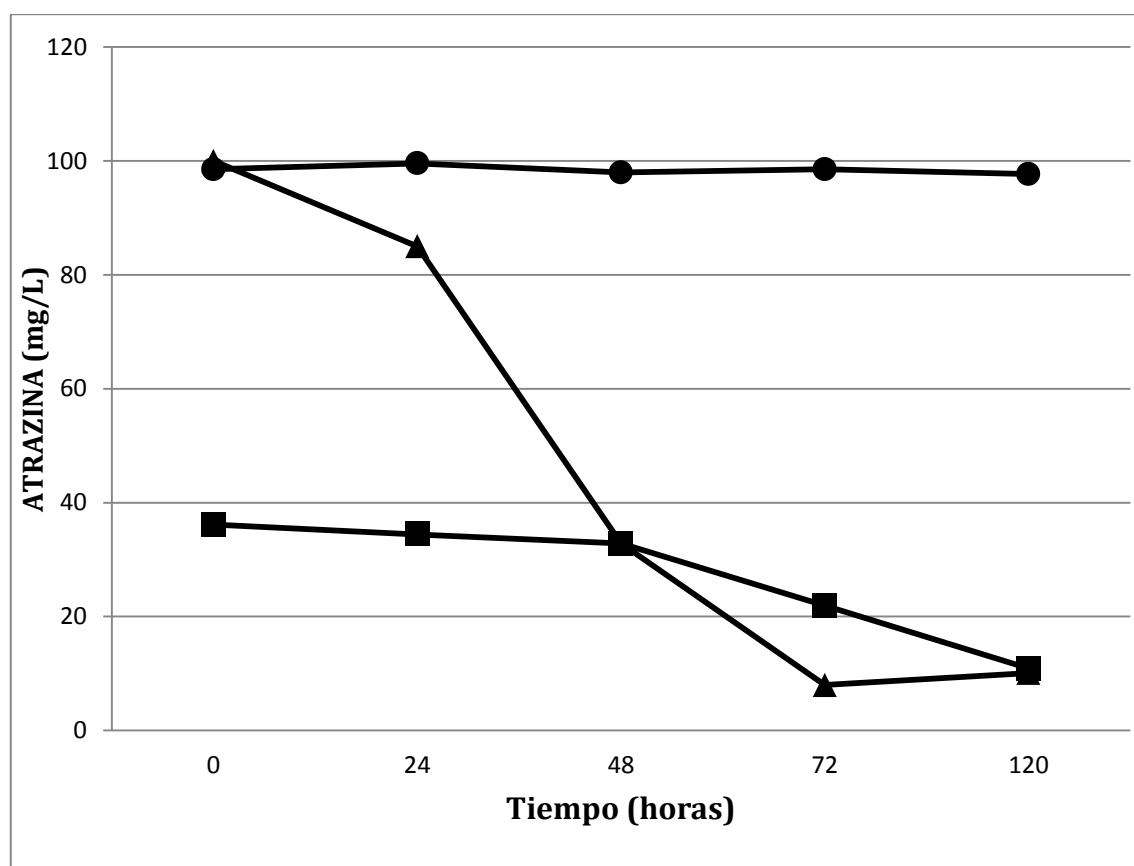
**Figura 7.** Se muestra la cinética de crecimiento y aclaramiento del consorcio MIG-AI dentro de las 120 horas.

### 5.6 Cuantificación de la degradación de la atrazina por el consorcio MIG-AI.

El consorcio MIG-AI consume el 70% de atrazina cuando se cultiva a 100 mg/L de atrazina en 48 horas aproximadamente, alcanzando valores estables después de las 72 horas (Tabla 13 y Fig.8). El consorcio MIG-AI inoculado en medio líquido MS a 40 mg/L de concentración inicial de atrazina, consume el 18% dentro de las 48 horas, alcanzando valores estables después de las 120 horas. Estos resultados indican que el consorcio MIG-AI consume mayor atrazina cuando la concentración del químico es de 100 mg/L en contraste de 40 mg/L probablemente, debido a una mayor población de microorganismos por mayor cantidad de nutrientes.

**Tabla 13.** Monitoreo de la concentración de atrazina en el cultivo del consorcio MIG-AI a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas.

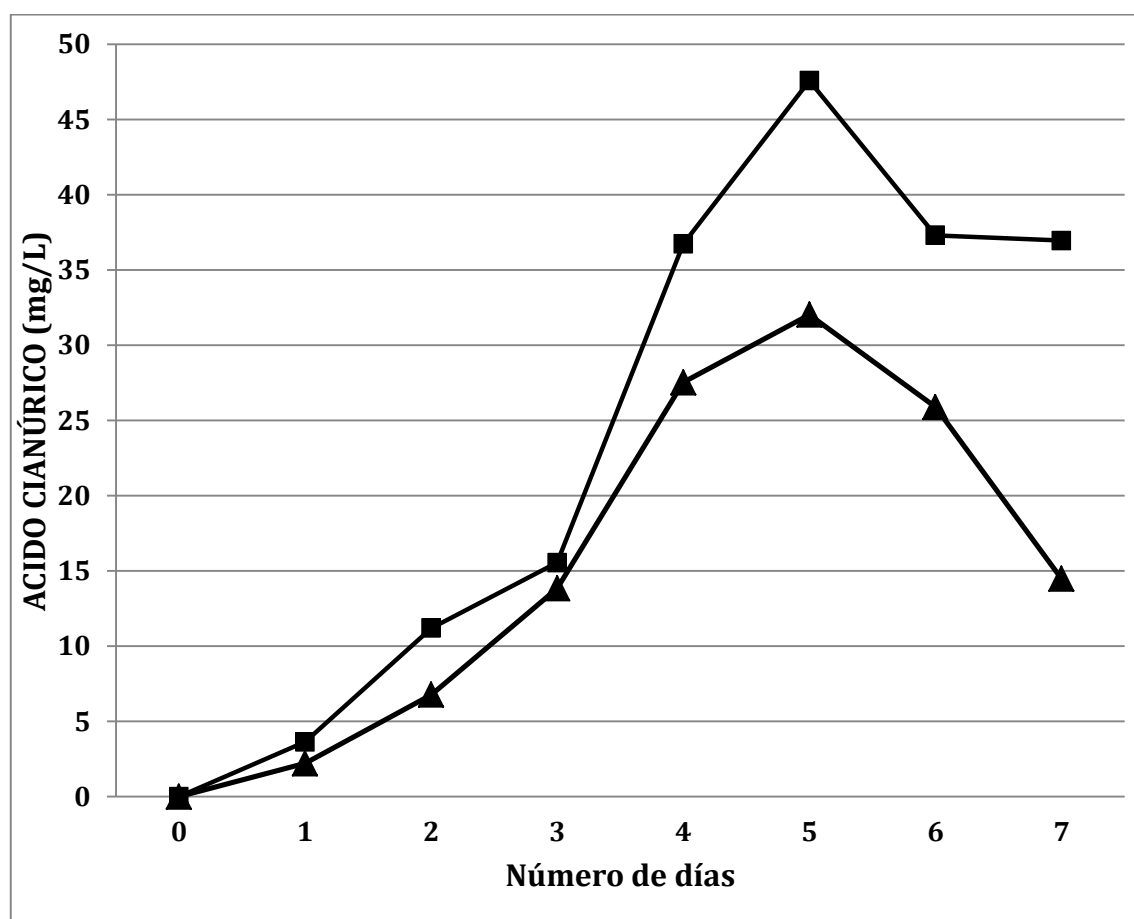
Horas	Control	Atrazina [40 mg/L]	Atrazina [100 mg/L]
0	98.52	36.15	100
24	99.56	34.43	85
48	97.98	32.82	32.82
72	98.54	21.91	21.91
120	97.69	10.89	10.89



**Figura 8.** Cinética de degradación de atrazina por el consorcio MIG-AI en medio MS, evaluado a 100 mg/L (▲), 40 mg/L (■) y con un control de 100 mg/L (●). Incubado a 28°C y 180 rpm. Promedio de tres repeticiones.

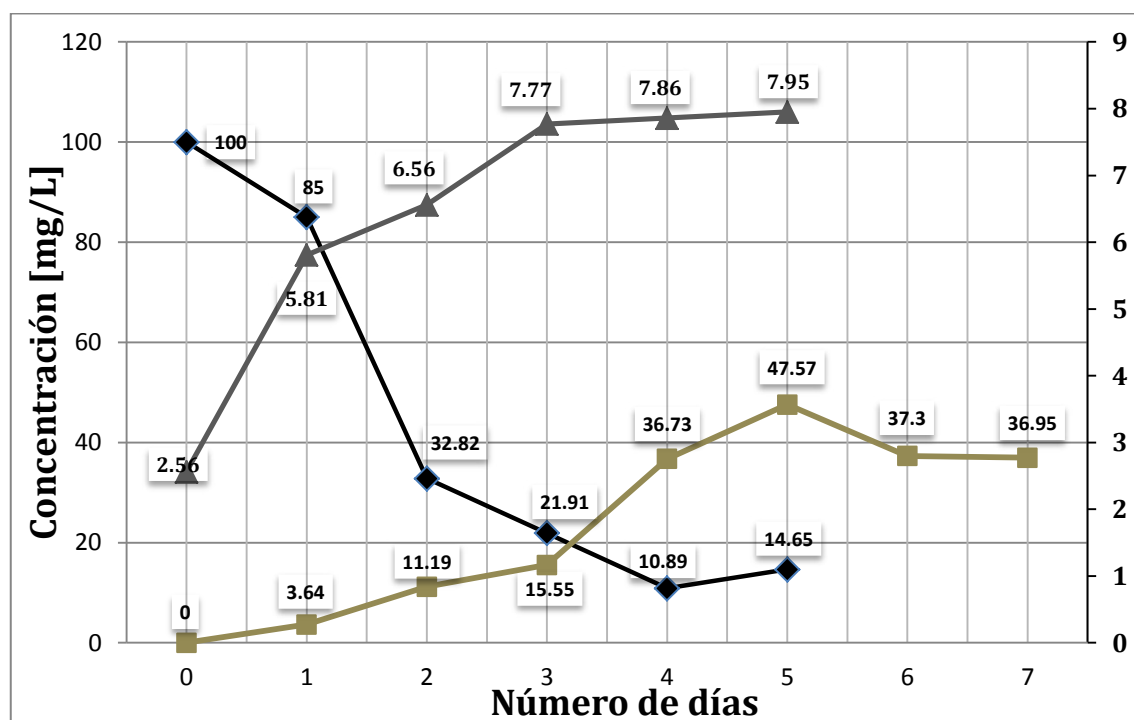
### 5.7 Evaluación de la presencia de ácido cianúrico por espectrofotometría.

El consorcio MIG-AI al degradar 100 mg/L y 40 mg/L del herbicida presenta una acumulación de ácido cianúrico gradual entrando en fase exponencial entre el 2 y 4 día, alcanzando la mayor concentración de ácido cianúrico en el 5 día; donde consumo de este metabolito por el consorcio bacteriano supera a la generación de ácido cianúrico, entrando a una fase de decaimiento. La producción de ácido cianúrico fue mayor en los medios que presentaron mayor concentración de atrazina, esto se debe probablemente a una mayor actividad del consorcio por mayor consumo de nutrientes y producción de metabolitos, como se aprecia en la figura 9.



**Figura 9.** Cinética de la formación del ácido cianúrico a lo largo de la degradación de la atrazina del consorcio MIG-AI evaluado a 100 mg/L (■) y 40 mg/L (▲).

El consorcio MIG-AI al degradar 100 mg/L del herbicida presenta una mayor actividad de degradación entre las 24 y 48 horas que es concordante con un mayor aumento de la población bacteriana. La producción del ácido cianúrico supera a su consumo hasta el quinto día, siendo acorde con el crecimiento poblacional lento y gradual entre el 3 y 5 día (Fig. 10).



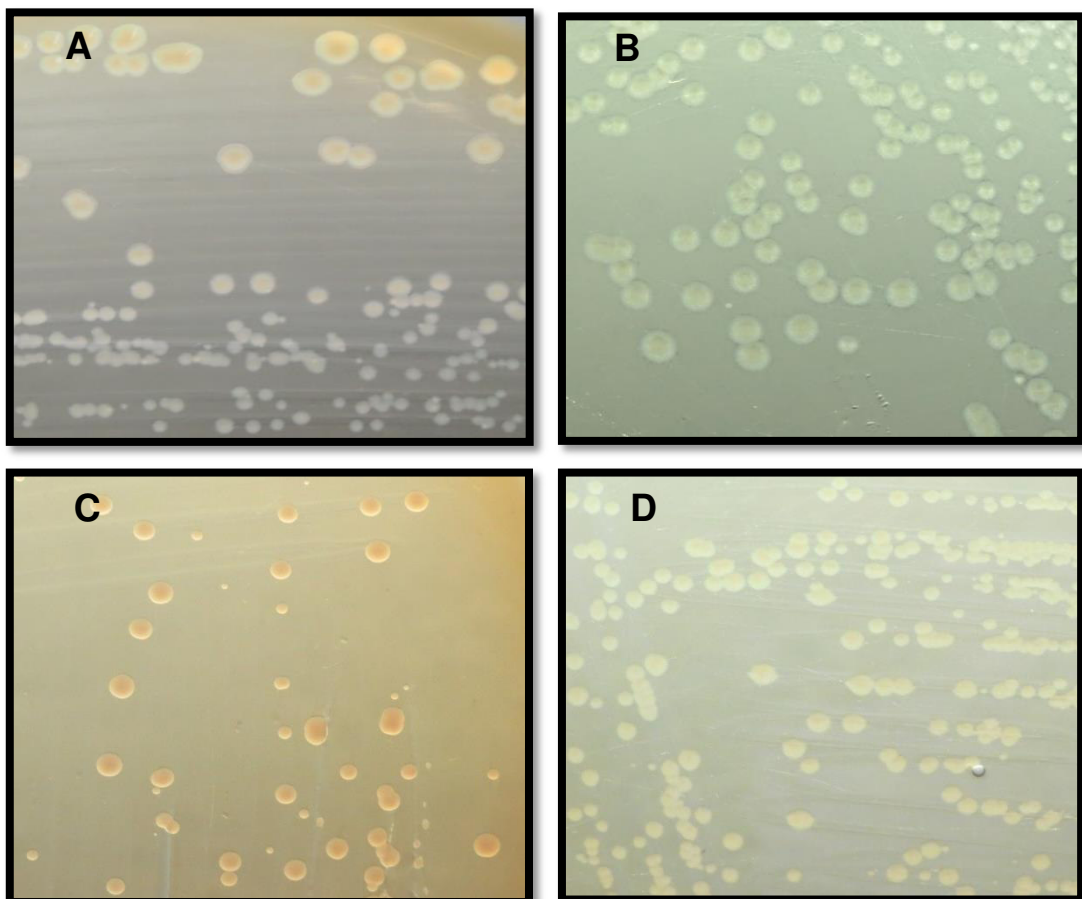
**Figura 10.** Se muestra la cinética de degradación de atrazina (—◆—), cinética de crecimiento del consorcio MIG-AI (—▲—) dentro de los 5 días, y la detección de ácido cianúrico (—■—) dentro de los 7 días. En medio MS con 100 mg/L de atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno.

## 5.8 Aislamiento de bacterias del consorcio seleccionado

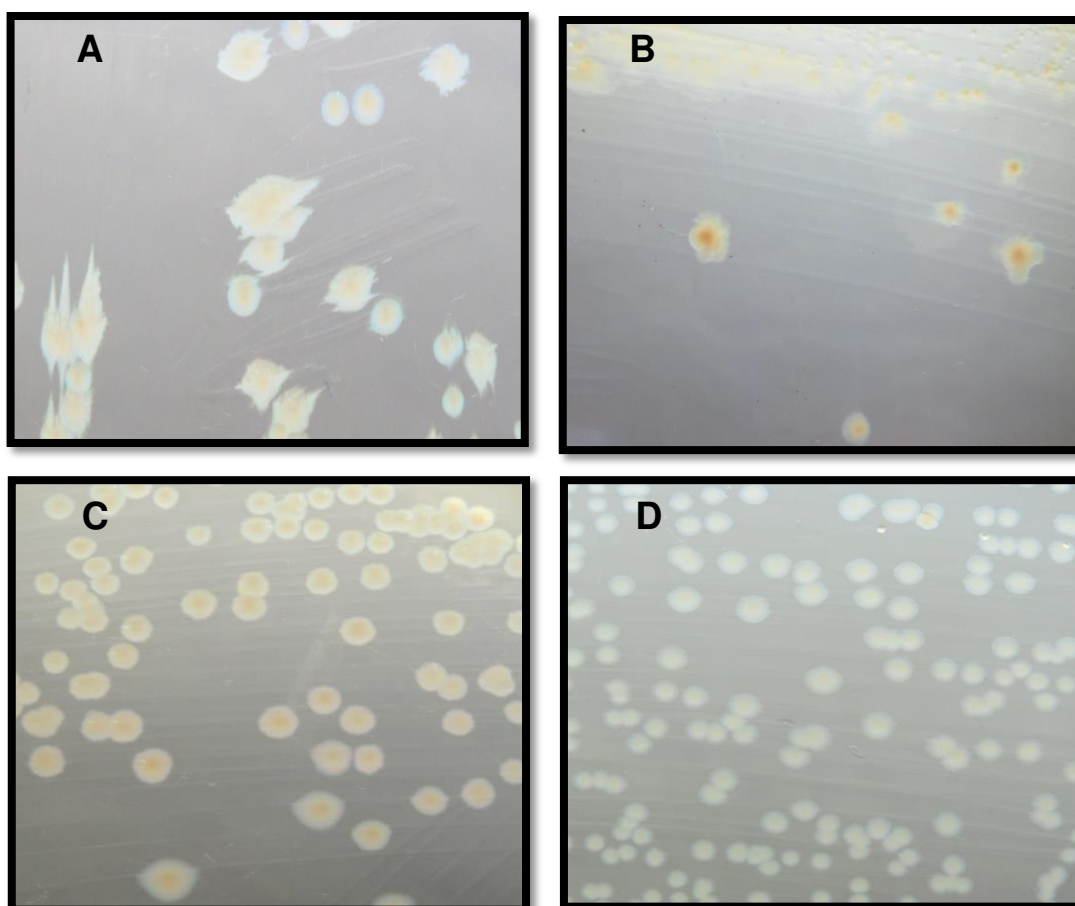
El aislamiento de bacterias presentes en el consorcio fue desarrollado dos veces obteniéndose en el primer aislamiento las cepas MIG-AI/1, MIG-AI/2, MIG-AI/4G y MIG-AI/5; en el segundo aislamiento se obtuvo las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/24C, MIG-AI/120A y MIG-AI/120B. Los medios de cultivo fueron reactivados en 3



oportunidades con trasposos sucesivos a nuevos medios, para asegurarse la presencia de los consorcios, para ser diluidos y sembrados por diseminación sobre placas TSA. En el primer aislamiento los consorcios fueron tomados a las 72 horas de cultivo. En el segundo aislamiento el consorcio fue sembrado a las 24, 48, 72 y 120 horas de cultivo, apreciándose a 2 cepas abundantes hasta las 24 horas codificados con MIG-AI/24A, MIG-AI/120B, a las 48 horas predominaron MIG-AI/24C y MIG-AI/120B. Posteriores días se apreciaron solo 2 cepas, la MIG-AI/120A y MIG-AI/120B. En el aislamiento se observaron pequeñas colonias de forma puntiforme con un diámetro menor a 1mm de difícil aislamiento, cuyo crecimiento fue posterior a las 96 horas de incubación. Las 8 cepas fueron reactivadas en TSB y sembradas por estriado en TSA para estudio culturales (Fig. 11 y Fig. 12).



**Figura 11.** Colonias de las cepas del primer aislamiento crecidas en medio TSA. En A se observa colonias de la cepa MIG-AI/1. En B se observan las cepa MIG-AI/2. En C la cepa MIG-AI/4G, y en D la cepa MIG-AI/5.



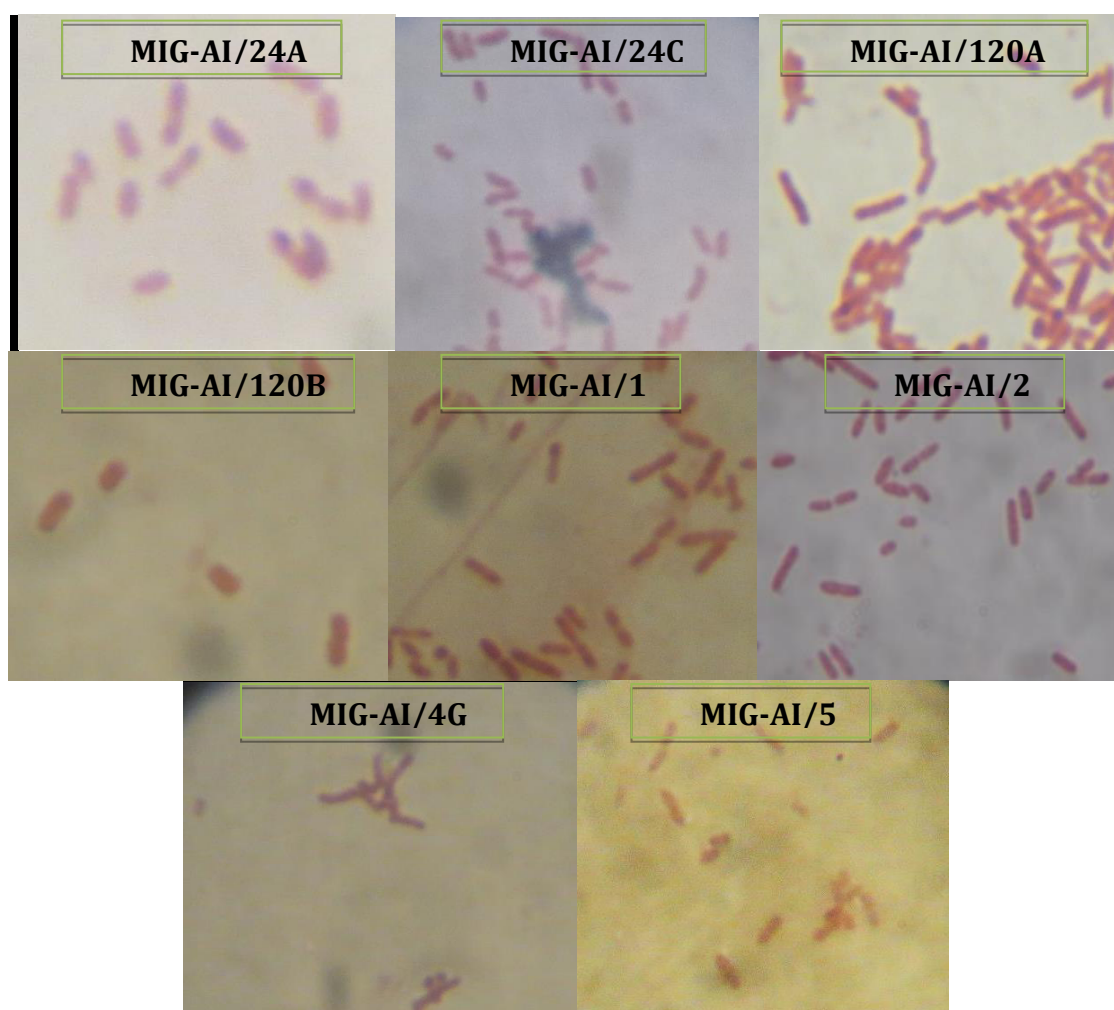
**Figura 12.** Colonias de las cepas del segundo aislamiento crecidas en TSA. En A se observa colonias de la cepa MIG-AI/24A. En B se observa la cepa MIG-AI/24C. En C la cepa MIG-AI/120A, y en D la cepa MIG-AI/120B.

### 5.9 Caracterización microscópica y macroscópica de las cepas aisladas.

Las 8 cepas aisladas son bacilos Gram negativos, siendo la cepa MIG 120B un bacilo corto Gram negativo como se aprecia en la figura 13. Las cepas aisladas fueron reactivadas en medio TSB y sembradas en TSB y TSA para evaluar sus características macroscópicas, resultado que las cepas MIG-AI/120A, MIG-AI/1 y MIG-AI/120B crecieron mucho más rápido y más grandes que las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/24C, MIG-AI/4G, MIG-AI/2 y MIG-AI/5 (Tabla 14, 15 y 16). Las cepas de forma puntiformes y de tamaño menor a 1 mm, no fueron capaces de crecer en medio TSB y

TSA después de las 120 horas, manteniéndose dentro del consorcio en medio MS con atrazina.

Las características culturales de las cepas aisladas fueron: forma circular, borde entero, elevación plana, textura cremosa, brillante de pigmentación crema con elevación plana y entera; a excepción de MIG 24C que difiere con el borde irregular y pigmentación amarilla. (Tabla 14).



**Figura 13.** Tinción Gram de las cepas bacterianas del consorcio MIG-AI. Todas resultaron bacilos o cocobacilos Gram negativos.

**Tabla 14.** Caracterización cultural de las cepas aisladas del consorcio MIG-AI en medio TSA

	<b>Cepas bacterianas del consorcio MIG-AI</b>							
<b>Fenotipo</b>	<b>MIG-AI/ 24A</b>	<b>MIG-AI/ 24C</b>	<b>MIG-AI/ 120A</b>	<b>MIG-AI/ 120B</b>	<b>MIG-AI/ 1</b>	<b>MIG-AI/ 2</b>	<b>MIG-AI/ 4G</b>	<b>MIG-AI/ 5</b>
Forma	Circular	irregular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Borde	entero	lobulado	entero	entero	entero	entero	entero	entero
Elevación	plana	elevada	plana	plana	plana	elevada	plana	plana
color	crema	Amarillo	crema	crema	crema	crema	crema	crema
textura	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa
tamaño	2mm	1mm	2-3mm	2-4mm	2mm	2mm	2mm	1mm
Luz reflejada	brillosa	brillosa	brillosa	brillosa	brillosa	brillosa	brillosa	brillosa

**Tabla 15.** Crecimiento de las cepas en medio líquido TSB y característica observadas

	<b>NÚMERO DE HORAS</b>					<b>Características fenotípicas</b>
<b>CEPAS</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	
<b>MIG-AI/24A</b>	-	++	++	++	+++	Sedimento, película y Turbidez
<b>MIG-AI/24C</b>	-	-	+	+	+++	Sedimento, película y Turbidez
<b>MIG-AI/120A</b>	+	++++	++++	+++++	+++++	Sedimento, película y Turbidez
<b>MIG-AI/120B</b>	+	+++	+++	++++	+++++	Sedimento y Turbidez
<b>MIG-AI/1</b>	+	++++	++++	+++++	+++++	Sedimento, película y Turbidez
<b>MIG-AI/2</b>	-	++	+++	+++	++++	Sedimento, película y Turbidez
<b>MIG-AI/4G</b>	-	+	++	+++	+++	Sedimento
<b>MIG-AI/5</b>	-	+	++	+++	+++	Sedimento, Turbidez y Anillo

\* -: Sin crecimiento. +: Pobre crecimiento. ++: Regular crecimiento. ≥ +++: Buen crecimiento.

**Tabla 16.** Crecimiento de las cepas aisladas del consorcio MIG-AI en medio sólido TSA

CEPAS	NÚMERO DE HORAS*				
	24	48	72	96	120
MIG-AI/24A	+	+	++	+++	++++
MIG-AI/24C	-	-	+	++	+++
MIG-AI/120A	+++	++++	++++	+++++	+++++
MIG-AI/120B	+	++	+++	++++	++++
MIG-AI/1	++	+++	++++	+++++	+++++
MIG-AI/2	++	+	+++	+++	+++
MIG-AI/4G	-	+	++	+++	+++
MIG-AI/5	-	+	++	+++	+++

\* -: Sin crecimiento. +: Pobre crecimiento. ++: Regular crecimiento. ≥ +++: Buen crecimiento.

### 5.11 Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas.

Siete cepas aisladas al ser sembradas en TSI no produjeron cambio de color, indicando que son aerobios alcalinos, además de ser indol negativo a excepción de la cepa MIG-AI/120B que viró completamente el color rojo para amarillo, indicando la utilización de los tres azúcares evaluados, como es la glucosa, lactosa y sacarosa; y fue indol positivo. El medio LIA indicó que todas las cepas aisladas descarboxilan la lisina, y no reducen las sales de hierro, ni producen ácido sulfhídrico.

Las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/120A, MIG-AI/1 y MIG-AI/5 crecieron en medio agar cetrimida para *Pseudomonas sp.* sin producir pigmentación alguna, como pioverdina. La prueba de la catalasa que se apreció al adicionarse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% sobre muestras de cada cepa, fue positivo para 7 cepas por la formación inmediata de burbujas que confirmó producción de oxígeno y la presencia de la enzima catalasa, a excepción de la cepa MIG-AI/24C que fue catalasa negativo (Tabla 17).

**Tabla 17.** Pruebas bioquímicas básicas de las cepas aisladas del consorcio MIG-AI en los medios recomendados

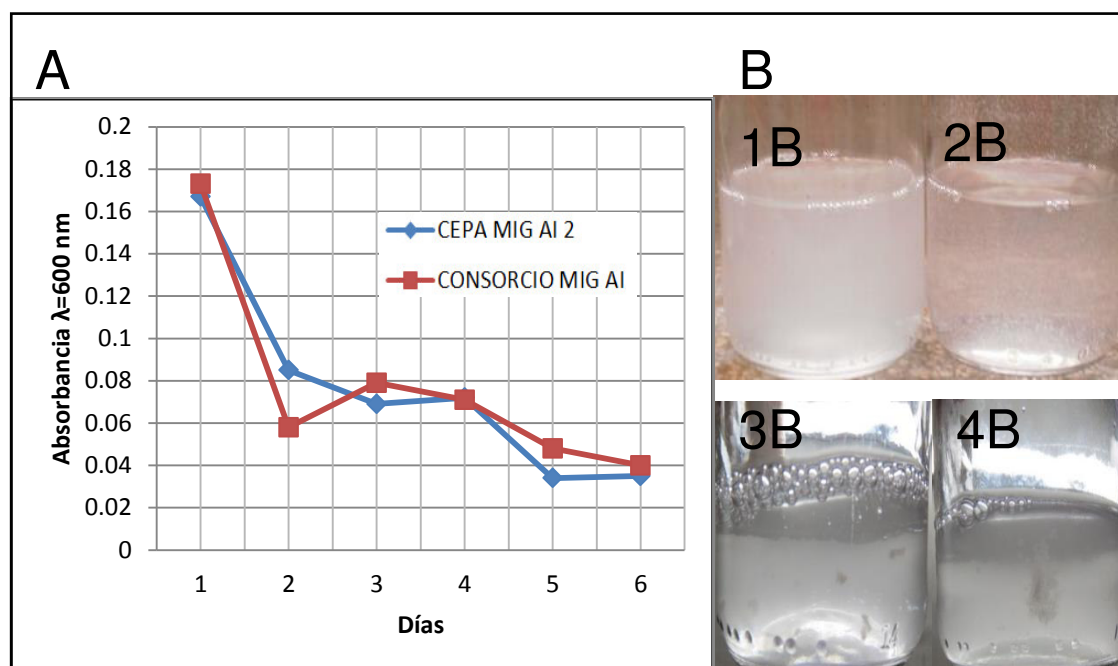
ENSAYOS		MIG-AI/ 24A	MIG-AI/ 24C	MIG-AI/ 120A	MIG-AI/ 120B	MIG-AI/1	MIG-AI/2	MIG-AI/ 4G	MIG-AI/5
TSI	Lactosa	-	-	-	+	-	-	-	-
	Glucosa	-	+	-	+	-	-	-	-
	Sucrosa	-	-	-	+	-	-	-	-
	H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gas	-	-	-	+	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LIA	Descarboxila Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+
	Desamina Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-
	H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
SIM	Movimiento	+	+	+	+	+	+	+	+
citrato		+	-	+	-	+	+	-	-
catalasa		+	-	+	+	+	+	+	+
McConkey		Lac -	Lac-	Lac-	Lac+	Lac-	Lac-	Lac-	Lac-
Cetrimida		+	-	+	-	+	-	-	+
		NP		NP		NP			NP

NP: No pigmentación pioverdina.

## 5.12 Evaluación de la degradación de atrazina por las cepas bacterianas.

### 5.12.1 Evaluación por aclaramiento y biodegradación de atrazina.

De las 8 cepas evaluadas, solo la cepa MIG-AI/2 generó aclaramiento dentro de las 72 horas, concordante con la curva cinética de aclaramiento del consorcio que fue aislado inicialmente. Las demás cepas no fueron capaces de producir aclaramiento alguno. Sin embargo a los 7 días de incubación se aprecian unos artefactos en suspensión de las cepas MIG-AI/24C, MIG-AI/120B sin aclaramiento alguno. A los 14 días estos artefactos se mantienen y se aprecia un leve aclaramiento que no fue significativo (Fig.14). Las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/24C, MIG-AI/120A, MIG-AI/1, MIG-AI/2, MIG-AI/4G, y MIG-AI/5 no generaron aclaramiento dentro de las 72 horas de cultivo.



**Figura 14.** En A, cinética de aclaramiento que generó la cepa MIG-AI/2 (  $\text{---}\blacklozenge\text{---}$  ) en comparación al consorcio MIG-AI (  $\text{---}\blacksquare\text{---}$  ), en medio MS con atrazina (100 mg/L). En B se muestra el proceso de aclaramiento: 1B, control; 2B, aclaramiento por MIG-AI a los 2 días de cultivo; 3B, aclaramiento por MIG-AI/24C; 4B, MIG-AI/120B a los 14 días de cultivo.

### 5.12.2 Evaluación de la degradación de atrazina y presencia de ácido cianúrico.

Las 8 cepas no degradaron la atrazina y sus resultados no fueron significativos a los 14 días. La presencia de ácido cianúrico fue detectado en concentraciones mínimas en los cultivos de las cepas MIG-AI/120B y MIG-AI/2, a los 7 y 14 días como se aprecia en la tabla 19.

**Tabla 18.** Datos de la concentración de ácido cianúrico evaluados a las 5, 7 y 14 días con espectrofotometría a 525 nm para evaluar la presencia de Ácido cianúrico

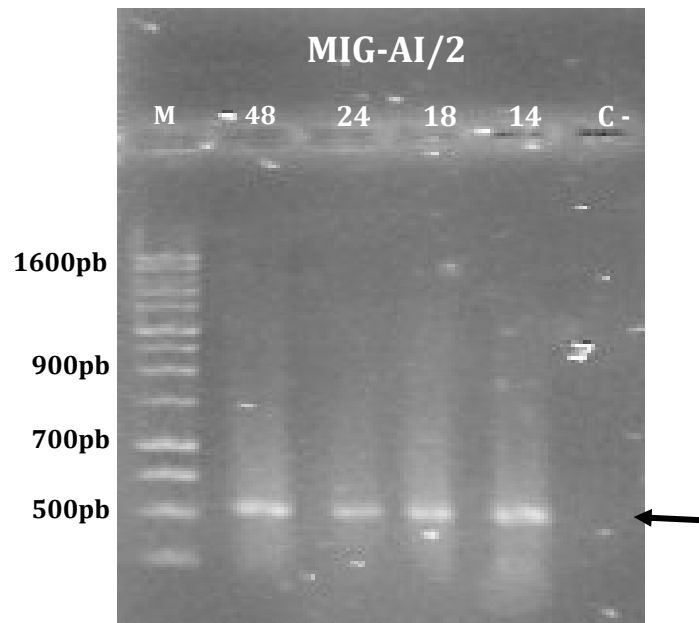
	Cepas bacterianas aisladas del consorcio MIG-AI (mg/L)							
DIAS	MIG-AI /24A	MIG-AI /24C	MIG-AI /120A	MIG-AI /120B	MIG-AI /1	MIG-AI /2	MIG-AI /4G	MIG-AI /5
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0.07	0	0.01	0	0
7	0	0	0	0.08	0	0.04	0	0
14	0	0	0	0.23	0	0.16	0	0

La cepa MIG-AI/2 fue cepa única de los 8 aislados que generó un aclaramiento del medio dentro de las 72 horas (Fig. 14); sin embargo, su mantención en medio TSA sin atrazina durante 2 meses, degeneró su capacidad degradativa.

### 5.12.3 Extracción, amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S.

Se logró extraer satisfactoriamente el DNA de las cepa MIG-AI/2 con el Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®) a las 14, 18, 24 y 48 horas, y se amplificó las 500 pb esperadas del gen rRNA 16S con los iniciadores y el protocolo que se encuentra detallado en el ANEXO 02 (Fig. 15).





**Figura 15.** Amplicones de 500 pb del gen rRNA 16S de la cepa MIG AI 2 a las 14, 18, 24 y 48 horas. M: Marcador de tamaño molecular de 1600 pb. C: Control negativo. La flecha indica el tamaño del producto esperado (500 pb).

#### 5.12.4 Cepa identificada mediante análisis del gen rRNA 16S.

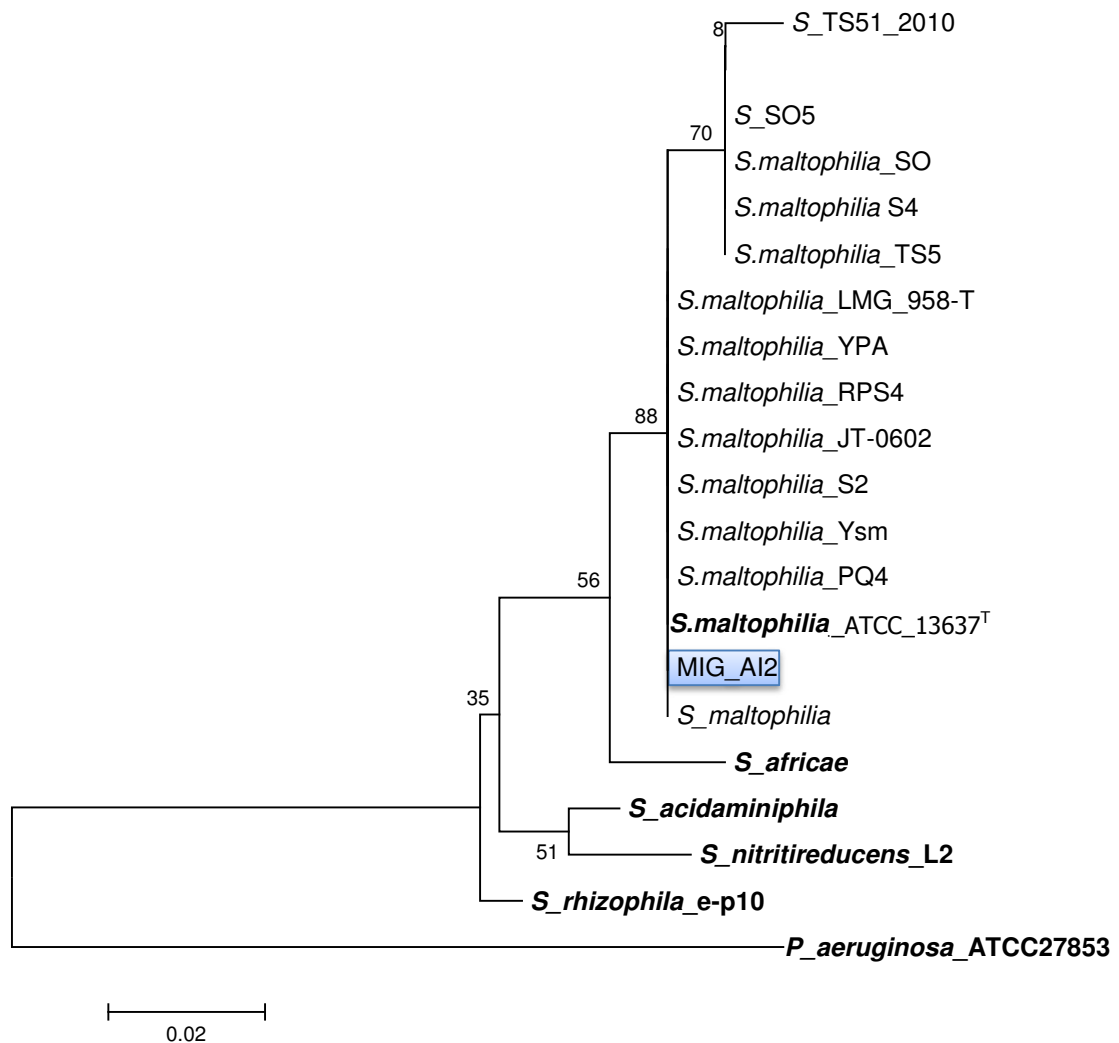
La secuencia consenso del gen rRNA 16S de MIG-AI/2 fue comparada con la Base de Datos mediante el programa BLASTn 2.0, y se obtuvo como resultado una identidad de 99% y una similitud de 100% con *Stenotrophomonas maltophilia* S4 (KF542911.1), *Stenotrophomonas maltophilia* TS51(2010)(GU998810.1), *Stenotrophomonas maltophilia* (DQ813325.1), y con similitud de 99% con *Stenotrophomonas maltophilia* S2(KF542909.1), *Stenotrophomonas* sp. S2 (KF542909.1), *Stenotrophomonas P-Q-4* (KC991320.1), *Stenotrophomonas* JT-0602 (JN571747.1); así como otras secuencias de bacterias no cultivables (Fig. 16).

Para la construcción del árbol filogenético se empleó el programa MEGA 5.0 con los siguientes parámetros: método estadístico *Neighbor-joining* con un modelo compuesto de Máxima Verosimilitud, incluyendo transiciones y transversiones y con

1000 bootstraps o réplicas. Se empleó 439 pb (ANEXO 08) de las secuencias ya alineadas, la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637T, las especies del género *Stenotrophomonas* sp, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como grupo externo. Finalmente, en el árbol filogenético obtenido se observa que la cepa MIG-AI/2 está conformando un clado robusto de 88% de probabilidad con la especie *Stenotrophomonas maltophilia* (Fig. 17).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas maltophilia strain S4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	802	802	100%	0.0	99%	<a href="#">KF542911.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured bacterium clone BT0A02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	802	802	100%	0.0	99%	<a href="#">KC208067.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas maltophilia strain S2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	800	800	99%	0.0	99%	<a href="#">KF542909.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured bacterium clone L4-1h2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	800	800	99%	0.0	99%	<a href="#">EU149050.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas maltophilia strain P-Q-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	798	798	99%	0.0	99%	<a href="#">KC991320.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas sp. S05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	798	798	99%	0.0	99%	<a href="#">HQ631948.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured bacterium clone BT0F05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	797	797	100%	0.0	99%	<a href="#">KC208123.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured bacterium clone BT0D03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	797	797	100%	0.0	99%	<a href="#">KC208100.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas maltophilia strain TS5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	797	797	99%	0.0	99%	<a href="#">HQ647280.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas sp. TS51(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	797	797	100%	0.0	99%	<a href="#">GU998810.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas maltophilia 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	797	797	100%	0.0	99%	<a href="#">DQ813325.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas sp. Y1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	795	795	99%	0.0	99%	<a href="#">KC502901.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas sp. G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	795	795	99%	0.0	99%	<a href="#">KC502894.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stenotrophomonas maltophilia strain JT-0602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	795	795	99%	0.0	99%	<a href="#">JN571747.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured Stenotrophomonas sp. clone BRCL-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	795	795	99%	0.0	99%	<a href="#">JX266034.1</a>

**Figura 16.** Se muestra el resultado del BLAST como resultado del análisis de la secuencia consenso rRNA 16S de la cepa MIG-AI/2. Se indica en rojo las secuencias con una alta similitud con la cepa *Stenotrophomonas maltophilia*.



**Figura 17.** Árbol filogenético de *Stenotrophomonas maltophilia* MIG-AI/2 [ ] en la que conforma un clado de 88% de probabilidad con diferentes secuencias de la especie *maltophilia*. Los valores de los nodos de las ramas representa el porcentaje de bootstraps y el valor 0.02 bajo la barra representa el porcentaje de sustituciones nucleotídicas.

#### **5.12.5 Ensayos fenotípicos de la cepa identificada.**

La cepa MIG-AI/2 presenta las siguientes características fenotípicas incubada a 28°C bacilo Gram negativo (24 horas en agar TSA), catalasa positiva de crecimiento rápido (18 hrs), móvil, prueba de oxidasa negativa y DNasa positiva, olor característico a amoníaco. Características culturales de colonia en agar TSA a 28°C por 24 horas: circular, opaca con centro amarillo y un promedio de 3 mm de diámetro. En medio sólido MS con glucosa al 0.3%, sulfato de amonio al 1% y atrazina con 20 mg/L de concentración, las características culturales a 28°C por 72 horas fueron: plana, de crecimiento lento (48 hrs), color blanco, opaco, circular y un diámetro de 2 mm.

## VI.- DISCUSIÓN

### 6.1. Evaluación de parámetros de la cinética de degradación de la atrazina.

Para el aislamiento de microorganismos con capacidad de biodegradar atrazina se escogió aquellos suelos que presentan una antigüedad de dos décadas a más de uso de herbicidas triazínicos, que son utilizados en cultivo de maíz principalmente, debido a ello se muestreo aleatoria y homogéneamente para abarcar todo el terreno agrícola de cultivo de maíz (Fig.3), que se encuentra ubicado en el distrito de La Molina, que presentaron un pH variable entre 6.8 a 7.5 (Tabla 8), este dato permite ajustar las condiciones adecuadas para preparar los medios de cultivo. Pero también cabe mencionar que los microorganismos presentan buena actividad para degradar atrazina a un pH de 6.5 y 7, no afectando el rendimiento y el crecimiento de los microorganismos, como se comprueba en los datos evaluados de la cinética tanto para la degradación como para el crecimiento (Fig.10). La influencia del pH sobre la adsorción de atrazina en sustancias húmicas fue estudiada por Wang *et al.* (2011), quienes encontraron que estas sustancias presentan alto potencial de adsorción de atrazina a bajo pH, disminuyendo aquel con el aumento del pH. La atrazina es una base débil que se protona a  $\text{pH} \leq 4$ , lo que favorece la adsorción de sustancias húmicas a través de interacciones iónicas (Ahmad y Rahman, 2009). La atrazina puede hidrolizarse con bastante rapidez en medios ácidos o alcalinos, pero es muy resistente a la hidrólisis en medios neutros; además también se reporta que la hidrolización de la atrazina a  $\text{pH}=4$  sin aditivos toma 244 días y de 1.73 días en presencia de ácidos húmicos (FAO, 2000). Estas características probablemente favorecen la biodegradación de la atrazina a un pH de 6.5 que es ligeramente ácido y un parámetro que presentaron nuestros medios de cultivo. Sin embargo se reporta que el pH óptimo para la degradación de la atrazina por consorcios microbianos fue de 7 en comparación a 6.5, 7.5, 8 y 8.5 (Dehghani *et al.*, 2013). La capacidad de

biodegradación por consorcios bacterianos no fue marcadamente alterada a pH de 6.5 y 7.5 a 30°C (Mandelbaum *et al.*, 1995).

La atrazina por encima de los 30 mg/L de concentración no es soluble (ATSDR, 2003), precipitándose y generando un blanqueamiento de los medios de cultivo líquidos, o formando un manto blanco si es revestido en la superficie de medios sólidos. La presencia de áreas de aclaramiento en los medios de cultivos, es un indicador que la atrazina se está solubilizando, produciéndose a nivel molecular un cambio fisicoquímico por la actividad bacteriana ya sea individual o en consorcio con otros microorganismos. Para asegurarnos que la solubilización se origina por participación de los consorcios microbianos, se trabajó con la concentración de 100 mg/L de atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno a 28°C. La degradación de la atrazina no se ve afectada cuando se trabajó entre 30 y 200 mg/L de concentración para medios líquidos con *Cryptococcus laurentii* y *Agrobacterium* J14a con un mejor crecimiento a 30°C de incubación (Nilanjana *et al.*, 2012). El simple aclaramiento de estos medios con atrazina, es un dato cualitativo que sirvió como base para aislar microorganismos que degradan este herbicida. Luego de 6 ciclos de crecimiento en los medios de cultivos a condiciones normales y estables, se identificó 7 consorcios microbianos de las 11 muestras evaluadas, que presentan capacidad de solubilizar la atrazina en el medio líquido dentro de las 72 horas. Este cambio físico-químico observable por aclaramiento de los medios líquidos se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, logrando identificar curvas de la cinética de aclaramiento con posterior leve aumento de turbidez que indicaría crecimiento microbiano.

El consorcio MIG-AI en los múltiples ensayos logró aclarar los medios líquidos dentro de las 24 a 48 horas, obteniendo el mejor rendimiento en producir esos

cambios fisicoquímicos en comparación a los otros 6 consorcios (Fig.5). De igual manera el aclaramiento fue evaluado en medios sólidos, para lo cual implementamos una metodología a partir del Gesaprim 90 WG que es el herbicida de más alto porcentaje de atrazina en el mercado peruano, con un 90% de atrazina, del cual eliminamos al máximo los coadyuvantes, tensioactivos, y sustancias solubilizantes adheridas en cada gránulo de este herbicida, por lavado con agua ultrapura, para evitar en mayor medida que estos químicos puedan interferir en nuestro experimento. La atrazina previamente preparada fue disuelta en acetona y sembrada artesanalmente, revistiendo la superficie de los medios sólidos MS. La presencia de áreas de aclaramiento fue generada por los 7 consorcios que demostraron que producen cambios físico-químicos en la atrazina, utilizándolo como única fuente de carbono y nitrógeno (Fig.6). Los consorcios MIG-AI y MIG-G generaron áreas de aclaramiento dentro de los 3 y 4 días, los otros 5 consorcios presentaron áreas de aclaramiento posteriores a los 6 días (Tabla 11). Por las evaluaciones de rendimiento y aclaramiento en medio líquido y sólido, fue seleccionado el consorcio MIG-AI para su análisis microbiológico, pruebas de biodegradación, y caracterización molecular de las cepas que presentan características idóneas para la degradación de la atrazina; también, los consorcios se sembraron en medios sólido MS con glucosa y sulfato de amonio como fuentes de Carbono y Nitrógeno, que previamente fueron revestidos con una fina capa de atrazina en su superficie. Después de 10 días de incubación no se apreciaron áreas de aclaramiento. Estos resultados confirman que los consorcios tienen preferencia estricta con respecto a la glucosa como fuente de carbono y el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Resultado similar se obtiene en medio de cultivo líquido, que no presenta aclaramiento de los medios después de los 5 días, pero sí crecimiento microbiano (resultados no mostrados). La presencia de carbono y de nitrógeno mineral en el suelo limitan la biodegradación de la atrazina, debido a que los microorganismos utilizan preferentemente esas fuentes de carbono y de nitrógeno

que están disponibles para su metabolismo, en lugar de emplear la molécula de atrazina como fuente de nutrientes (Guillén-Garcés *et al.*, 2007; Nilanjana *et al.*, 2012).

Estudios del proceso de biodegradación de atrazina en suelos agrícolas reportan una vida media de 120 días para el suelo DR063 en Sinaloa (González-Márquez y Hansen., 2009), otros estudios encuentran vidas medias en suelos superficiales que van de 0.99 a más de 35 días en suelos de Cárdenas, Tabasco y DR063; mientras que González-Márquez y Hansen (2009) describen vidas medias de 2 a 5.8 años en perfiles de suelos de DR063. Estas diferencias de vidas medias se explicaron por la presencia de fertilizantes nitrogenados y de sales que retardan la degradación de la atrazina (Guillén Garcés *et al.*, 2007). Crecimiento celular en medios conteniendo atrazina y una fuente adicional de carbono mostró menos degradación y biomasa en *Cryptococcus laurentii*, similar es resultados fueron observados en el caso de *Agrobacterium radiobacter* J14a, donde la adicional fuente de carbón tal como sucrosa no incrementó significativamente la tasa de degradación de atrazina (Struthers, 1998); sin embargo se reporta que la adición de sucrosa y citrato de sodio en medios de 100 ppm de atrazina obtuvo una alta tasa de biodegradación de 87.72%, las demás fuentes de carbono como glucosa, sucrosa, citrato de sodio y almidón disminuyeron la tasa de biodegradación del herbicida (Dehghandi *et al.*, 2013).

Uno de los índices para demostrar que hay degradación de la atrazina es evaluar el comportamiento de la cinética microbiana a lo largo del periodo de incubación, para lo cual se trabaja con 40 y 100 mg/L de concentración de atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno. El consorcio MIG-AI llega a la fase de latencia a las 72 horas con 40 mg/L y a las 120 horas con 100 mg/L de concentración. Cuando hay más



concentración de atrazina la población microbiana se ve sostenida más en el tiempo y llegan a la fase latencia en un tiempo más prolongado. Este resultado es proporcional con el aclaramiento de los medios de cultivo con 100 mg/L de atrazina, cuya fase exponencial de aclaramiento abarca de las 12 hasta las 72 horas, que finalmente se aprecia con un leve aumento de la absorbancia que es coincidente con la turbidez del medio, que se debe al máximo crecimiento de los cultivos que han llegado a la fase estacionaria de la cinética de crecimiento (Fig.7). Estos resultados tuvieron una mayor eficiencia en la remoción de la atrazina frente a consorcios reportados en cultivos LFA6A y LFB3A que degradaron de manera estable después del tercer día de cultivo, y valores similares al consorcio LFB5A que removieron la atrazina antes de las 72 horas (Mandelbaum, *et al.*, 1995).

Se conoce que la atrazina es una molécula química que presenta una absorción máxima a una longitud de onda de 221 nm dentro del espectro UV, y debido a ello fue monitoreado cada 24 horas la cinética de degradación del consorcio microbiano, observándose un rango de detección dentro de los 2 hasta 35 mg/L de concentración (Anexo 6). Se aprecia que el consorcio MIG-AI dentro de las 24 a 72 horas degrada mejor la atrazina a una concentración de 100 mg/L debido a que aumenta la población bacteriana permitiendo un mayor consumo de atrazina, mientras la atrazina de 40 mg/L presenta una degradación gradual concordante con el crecimiento de la población bacteriana que termina su fase exponencial a las 72 horas. Similares resultados obtuvo Rasodevich *et al* (1995), al reportar la degradación de atrazina y la fase de estacionaria temprano del crecimiento del consorcio por absorbancia a 660 nm y conteo en placas a las 40 horas, trabajando con 21.5 mg/L de atrazina. Esta concentración usada por Rasodevich *et al* (1995) permite evaluar el crecimiento bacteriano por absorbancia a 660 nm porque se encuentra en la fase soluble; mientras en la presente investigación se trabajó con 100 y 40 mg/L en fase no soluble,

y se evaluó con absorbancia a 600 nm la degradación de atrazina, al aclararse los medios, detectándose aumento de turbidez en el rango de las 48 y 72 horas, que coincide con el final de la fase logarítmica y estacionario temprano.

El ácido cianúrico es un metabolito de la vía metabólica de degradación de la atrazina, que presenta un anillo heterocíclico que es característico de todas las moléculas de la familia de las *s*-triazinas, y cuyo rompimiento del anillo heterocíclico, facilita la mineralización completa de la atrazina. Su cuantificación se realizó por reacción con la melanina que se une preferentemente con las moléculas de ácido cianúrico, manteniéndolo en suspensión y facilitando la evaluación por absorbancia a una longitud de onda de 525 nm (HACH, 1989). Este método es más específico y preciso que la cuantificación por espectrometría UV a absorbancias de 212 y 213 nm, que presentan interferencias con la atrazina y sus metabolitos producidos durante su mineralización.

## **6.2. Evaluación de la degradación de atrazina por cepas del consorcio MIG AI.**

La cepa MIG-AI/120A, MIG-AI/120B, MIG-AI/1, MIG-AI/2 son las cepas que presentan mayor frecuencia poblacional al ser observadas dentro de las 120 horas de cultivo con atrazina, a diferencia las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/24C, MIG-AI/5 y MIG-AI/4G. La cepa MIG-AI/120A y MIG-AI/120B sobresalió después de las 72 horas (Fig.20). Los genes del catabolismo de la atrazina se han encontrado en microorganismos aislados de cuatro phyla (Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroides) de los seis continentes (Krutz *et al.*, 2010). Mayoría de los microorganismos aislados contienen los genes degradadores de atrazina en plásmidos auto transmisibles, permitiendo de esta manera su distribución en diversos phyla, mediante su transferencia horizontal (Ghosh *et al.*, 2008; Vaishampayan *et al.*, 2007; Devers *et al.*, 2007; Devers *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 2005). La alta

conservación de los genes degradadores de atrazina es consistente con un origen único y reciente de esta capacidad degradativa y su subsecuente dispersión global, mediante transporte en polvo y depositación atmosférica en otra región del mundo (Prospero *et al.*, 2005).

La cepa MIG-AI/2 en su primer aislamiento logró solubilizar la atrazina dentro de las 72 horas y fue un candidato para su caracterización molecular (Fig.16); sin embargo, al mantenerla en medios TSA sin atrazina, dentro de 2 meses, fue perdiendo su capacidad degradativa, como se aprecian en las evaluaciones de la presencia de ácido cianúrico (Tabla 18), realizadas posterior a las pruebas de caracterización molecular. La inestabilidad fenotípica de bacterias Gram negativas como la *Pseudomonas sp.* cepa ADP, para degradar xenobióticos, se tiene reportado durante su cultivación y propagación en medios enriquecidos que presentan otras fuentes de carbono y nitrógeno de mayor afinidad por los microorganismos, como lo observado al cultivar la cepa *Pseudomonas sp.* ADP en medios que presentan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en ausencia de atrazina como única fuente de nitrógeno (De Souza *et al.*, 1998). También se ha reportado que las cepas bacterianas con capacidad degradativa de atrazina, mantenidos en medio Luria-Bertan generó con el tiempo la pérdida de las primeras enzimas que degradan la atrazina, esto fue corroborado con análisis de PCR y experimentos con radiomarcadores para los genes *atz A*, *-B* y *-C*. Estos genes se encuentran ubicados en 96kb del pADP-1 que fue transferido para la cepa *Escherichia coli* con una frecuencia de  $4.7 \times 10^{-2}$ , que sugiere un mecanismo molecular para la dispersión de los genes *atzABC* hacia otras bacterias de suelos (De Souza *et al.*, 1998). La inestabilidad fenotípica de la capacidad degradativa de muchos compuestos xenobióticos distintos a atrazina ya se ha reportado en otras bacterias aislada de suelos (Nakatsu *et al.*, 1991; Tomasek *et al.*, 1989), y en esta investigación se reporta esta inestabilidad para la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* MIG-AI/2.

Las 8 cepas aisladas, individualmente fueron evaluadas sin lograr degradar la atrazina, a excepción de la cepa MIG-AI/2 que posteriormente perdió su capacidad degradativa de manera espontánea. La cepa MIG-AI/120B y MIG-AI/24C generaron suspensiones que son aglomeraciones de bacterias que facilita la contaminación por hongos. Estos resultados descartan cualquier capacidad para aclarar y degradar la atrazina de manera individual. El uso del antimicótico cicloheximide a 25 mg/L en reemplazo de fluconazol en todas las pruebas, permitió corroborar la no formación de suspensiones, ni solubilización de la atrazina después de los 14 días.

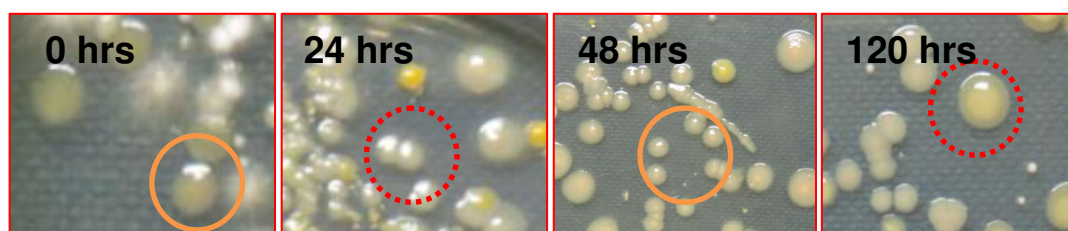
Se tiene presente que las absorbancias medidas a 221 nm menores a 0.040 es confirmatorio que la atrazina se estaría solubilizando y degradando; pero también, se observó que medios con atrazina a 40 mg/L presentan un rango de absorbancia de 0.040 a 0.048, y medios con una concentración de 100 mg/L presenta valores entre 0.049 a 0.056 de absorbancia, estos datos se encuentran fuera del espectro de detección de atrazina que va desde 2 hasta 35 mg/L (Anexo 06). Las cepas MIG-AI/120B y MIG-AI/24C, obtuvieron absorbancias UV que variaron de 0.05 a 0.046 y 0.044; siendo estos datos no significativos por encontrarse lejos del rango de detección. Todas estas pruebas se realizaron a concentración inicial de 100 mg/L y fueron incubados en oscuridad para evitar que la fotodegradación pueda interferir con los resultados. A los 14 días se evaluó la presencia de ácido cianúrico, detectándose un mínimo grado de acumulación en la cepa MIG-AI/120B y MIG-AI/2 como se aprecia en la Tabla 19 que son las únicas cepas en la que se detectó presencia de ácido cianúrico a diferencia de la cepa MIG-AI/24C que no presentó esos resultados.

### 6.3. Identificación fenotípica de las cepas del consorcio MIG-AI.

Todas las cepas aisladas fueron bacilos Gram negativos, catalasa positivos, descarboxilación de lisina positivos, no producen sulfuro de hidrógeno, son indol negativo y no fermentadores, a excepción de la cepa MIG-AI/120B que es indol positivo y fermentador de glucosa, sacarosa y lactosa (Tabla 18). Las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/120A, MIG-AI/5, MIG-AI/1 y MIG-AI/2 presentan igual perfil bioquímico para las pruebas ensayadas y se aproxima al género *Pseudomonas spp.* que son no fermentadoras, no producen SH<sub>2</sub>, indol negativo con movimiento, citrato positivos y son aerobias alcalinas como lo describe Siegrist (2007); sin embargo, al ser sembradas en medio selectivo agar cetrimide para *Pseudomonas*, las cepas bacterianas MIG-AI/120A y MG-AI/1 presentaron rápido crecimiento a las 24 horas y de fenotipo similar, la cepa MIG-AI/24A y MIG-AI/5 presentó un crecimiento lento posterior a las 48 horas. La cepa *Stenotrophomonas maltophilia* MIG-AI/2 no presentó crecimiento en agar cetrimide (BD Pseudosel agar. 2013). Estos resultados indican que la cepa MIG-AI/1, MIG-AI/120A es muy probable que sean la misma cepa, debido a que presentan características fenotípicas similares (Tabla 15), difieren de la cepa MIG-AI/24A por la menor velocidad de crecimiento que presenta en TSA, TSB y agar cetrimide (Tabla 16, 17 y 18). Las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/1 y MIG-AI/120A sembradas en agar selectivo cetrimida no producen pioverdina, piocianina, piorrubina, piomelanina, que son pigmentos característico de *Pseudomonas aeruginosa* y quinolobactin para *Pseudomonas fluorescens* (Siegrist, 2007). La gran complejidad de la familia *Pseudomonaceae* y otras afines, ha permitido hasta el momento individualizar a 29 géneros según el Manual de Bergey, y 206 no claramente difundidos (Martínez *et al.*, 2001). Por los resultados obtenidos es probable que las cepas MIG-AI/24A, MIG-AI/120A, MIG-AI/1 y MIG-AI/5 pertenezcan al género *Pseudomonas sp.* y *Aeromonas sp.*

Las cepas MIG-AI/120A, MIG-AI/120B y MIG-AI/1 presentaron mayor velocidad de crecimiento en TSB, a diferencia de las cepas MIG-AI/2, MIG-AI/4G, MIG-AI/5, MIG-AI/24A y MIG-AI/24C que generan turbidez a partir de las 48 horas incubadas a 28°C; similares resultados se obtuvieron en medio TSA (Tabla 15 y 16). En medio sólido MS con atrazina, glucosa y sulfato de amonio las cepas MIG-AI/120A, MIG-AI/120B y MIG-AI/1 son las que mejor crecimiento presentan a las 72 horas, mientras las otras cepas presentaron crecimiento observable a los 5 días de incubación. Las placas de TSA sembradas del consorcio MIG-AI previamente diluidos, presentaron una gran diversidad de colonias pequeñas con un tamaño inferior a 1mm, cuyo aislamiento no fue posible, porque no crecieron en TSB y con pobre crecimiento en TSA cuando fueron resembrados, estos datos fueron evaluados por encima de las 120 horas de incubación (Fig.18). Debido a su difícil aislamiento y mantención en el medio TSA, estas cepas solo se conservan en su estado inicial de aislamiento, dentro del consorcio MIG-AI en medio líquido con atrazina.

Se han reportado degradación de herbicidas por consorcios bacterianos en 4 o más bacterias, de las cuáles fueron aisladas *Clavibacter michiganense* ATZ1 y *Pseudomonas* sp. CN1 que juntas mineralizan atrazina; sin embargo la velocidad de degradación del consorcio fue superior e incluso presenta mayor capacidad en degradar otros herbicidas s-triazínicos, en comparación a la degradación individual de *Clavibacter michiganense* ATZ1 (De Souza *et al.*, 1998).



**Figura 18.** La cepa MIG-AI/120B(—) y MIG-AI/120A(—) se aprecian a las 0, 24, 72 y 120 horas. Pequeñas colonias de forma puntiforme de color crema no cultivables en TSA y TSB, se observan alrededor de las colonias grandes a las 48 y 120 horas.

#### 6.4. Caracterización molecular de la cepa MIG-AI/2.

La secuencia parcial del gen rRNA ribosomal 16S de la cepa MIG-AI/2 permitió identificarla con 100% de similitud y 99% de identidad con *Stenotrophomonas maltophilia*. El alineamiento de la parcial secuencia de MIG-AI/2 con otras secuencias altamente similares obtenidas del análisis del BLAST y descargadas del GenBank, presentan un sitio polimórfico. La comparación con la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637T representa una similitud del 100%, y al compararla con la secuencias de las especies del género *Stenotrophomonas sp.* presenta una similitud de 95.89%, 95.67%, 95.21% y 94.98%, para *Stenotrophomonas africanae*, *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Stenotrophomonas nitritireducens* respectivamente, lográndose diferenciar a nivel de especie. La comparación de secuencias con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como grupo externo, presenta una similitud de 84.54%, permitiendo distinguir las cepas del género *Stenotrophomonas* de *Pseudomonas* (ANEXO 8).

Adicionalmente, las características fenotípicas ensayadas (ver 5.12.5) concuerda con el género *Stenotrophomona sp.* listadas en el Manual de Bacteriología y Sistemática de Bergey (Brenner *et al.*, 2005).

## VII. CONCLUSIONES

1. Los consorcios microbianos MIG-AI, MIG-BS, MIG-E, MIG-DI, MIG-G, MIG-AS y MIG-F con capacidad eficiente para degradar atrazina, fueron aislados de suelos agrícolas de nuestro medio con una antigüedad en el uso de herbicidas triazínicos mayor a 3 décadas.
2. La identificación molecular de la cepa MIG-AI/2, presentó una similitud del 100% y una identidad del 99% con *Stenotrophomonas maltophilia*, distinguiéndose filogenéticamente de las demás especies de *Stenotrophomonas sp.*
3. La cepa aislada MIG-AI/2 presentó inestabilidad en su actividad de degradación de atrazina, al ser mantenida en medio TSA sin atrazina.
4. El 97% del sustrato atrazina fue degradado eficientemente por el consorcio MIG-AI a las 72 horas de cultivo. A 100 mg/L de concentración inicial de atrazina se observó una velocidad específica de crecimiento de  $0.31 \text{ h}^{-1}$  ligeramente menor que cuando creció a 40 mg/L, en el que presentó  $0.32 \text{ h}^{-1}$ .



## **VIII. RECOMENDACIONES.**

1. Evaluar la capacidad de degradación por el consorcio MIG AI de otros herbicidas pertenecientes a la familia de las s-triazinas.
2. Para aumentar la sensibilidad y rango de detección en la cuantificación de la degradación de atrazina en concentraciones menores a 5 mg/L y mayores a 40 mg/L se debe usar HPLC.
3. Estudiar la enzima o enzimas involucradas en la degradación de atrazina por los consorcios aislados ya que podrían ser empleadas como potencial herramienta biotecnológica.
4. Se hace necesario realizar estudios para identificar y cuantificar la actividad de los genes involucrados en la mineralización de la atrazina de las cepas aisladas y los consorcios.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abanto Michel. Diversidad molecular de bacterias oxidadoras de hierro aisladas de drenajes ácidos de minas del Perú. Asesor: Dr. Pablo Ramírez Roca. Tesis Magister en Biología Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima. 2008.
2. Agency for Toxic Substances y Disease Registry (ATSDR). Reseña Toxicológica de la Atrazina. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU.2003, Servicio de Salud Pública. Disponible en internet: <[http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs153.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs153.html)>
3. Ahmad, Riaz.; Rahman, Anis. Sorption Characteristics of Atrazine and Imazethapyr in Soils of New Zealand: Importance of Independently Determined Sorption Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(22),10866-10875.
4. Altschul, S.; Gish, W.; Miller, E.; Myers, D.; Lipman, D. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol*. 1990, 215:403-410.
5. Bejarano, F.G. La Espiral del Veneno: Guía crítica ciudadana sobre plaguicidas. México. RAPAM. 2002, 226 pág.
6. Biradar, D.P.; Rayburn, A.L. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. *Journal of Enviromental Quality*. 1995, 24:1222-1225.
7. Blumhorst, M.; J. Weber. Chemical versus microbial degradation of cyanazine and atrazine in soils. *Pestic. Sci*. 1994, 42:79-84.
8. Brenner, Don; Krieg, Noel; Staley, James. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (volumen two: The proteobacteria part B the Gammaproteobacteria). Editor in Chief: George M. Garrity. Segunda edición. London New York: Springer Dordrecht Heidelberg, 2005.1136p. ISBN 0-387-95040-0.
9. Dehghani, M.; Nasser, S.; Hashemi, H. Study of Bioremediation of Atrazine under variable Carbon and Nitrogen Source by Mixed Bacterial Consortium Isolated

from Corn Field Soil in Fars Province of Iran. Journal of Environmental and Public Health. vol. 2013, Article ID 973165, p.7.

10. Devers, M.; Henry, S.; Hartmann, A.; Martin-Laurent, F. Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (atz) from *Agrobacterium tumefaciens* st96-4 Padp1:TN5 to bacteria of maize cultivated soil. Pest Manag Sci. 2005. 61, 870-880.

11. Devers, M.; El Azhari, N.; Kolic, N.U.; Martin-Laurent, F. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. FEMS Microbiol. Lett. 2007. 273, 78-86.

12. Davidson, P.C. Bioremediation of Groundwater Contaminated With Agricultural Chemicals. B.S. thesis. Asesor: Prasanta K. Agricultural Engineering Dept. University of Illinois, Urbana. USA. 2005.

13. De Souza, M.; Seffernick, J.; Martínez B.; Sadowsky M.; Wackett, L. The Atrazine Catabolism Genes *atzABC* are widespread and highly conserved. Journal of Bacteriology. 1998. 180(7):1951-1954.

14. Economic Commission for Europe. Impact of Agriculture in the Environment. In the environment in Europe and North-America. United Nations: Geneva, New York. 1992.

15. EPA. In National survey of pesticides in drinking water wells; Environmental Protection Agency. Washington, DC. 1990.

16. EPA. Triazine herbicides as atrazine in water by quantitative immunoassay. Environmental Protection Agency. Washington, DC. 2007.

17. FAO. Evaluación de la contaminación del suelo. Manual de referencia. 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. htm. [último acceso abril 23, 2013]. Disponible en internet: <<http://www.fao.org/docrep/005/x2570s/X2570S09>>.

18. Fíalo, A. Biorremediación de suelos contaminados con el herbicida Atrazina. Área Científico-Pedagógica de Ciencias Biológicas, Departamento de Ingeniería Química, 2004. IST, Brasil.
19. Frimmel, F.H.; Hessler, D.P. Photochemical degradation of Triazine and Anilide Pesticides in Natural Waters. Accepted for conference and publication at the ACS Conference on Environmental Aspects of Aquatic and Surface Photochemistry, San Francisco. 1992.
20. Fruchey, I.; Shapir, N.; Sadowsky, M.J.; Wackett, L.P. On the origins of cyanuric acid hydrolase: purification, substrates and prevalence of AtzD from *Pseudomonas sp.* Strain ADP. Applied and Environmental Microbiology. 2013. 69:3653-3657.
21. Galíndez, S. Biodegradación simultánea de los herbicidas atrazina y simazina por un cultivo bacteriano binario en un reactor de Biopelícula. Asesores: Ruiz, N., Galíndez, J. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Quimicobiológicas. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. 2010.
22. Ghosh, D.; Roy, K.; Williamson, K.E.; White, D.C.; Wommack, K.E.; Sublette, K.L.; Radosevich, M. Prevalence of lysogeny among soil bacteria and presence of 16s rRNA and trzN genes in viral community DNA. Appl. Environ. Microbiol. 2008. 74, 495-502.
23. Glaze, W.H.; Kang, J.W.; Chapin, D.H. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. Ozone: Science and Engineering. 1987. 9, 335-352.
24. Gonzáles-Marquéz L.; Hansen A. Adsorción y mineralización de atrazina y relación con parámetros de suelos del DR 063 Guasave, Sinaloa. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas. 2009. v. 26, núm. 3, p. 587-599.
25. Guevara-Almaraz, E. Determinación espectrofotométrica simultánea de los herbicidas 2,4-D, atrazina y dicamba en muestras de agua mediante tratamiento

quimiométrico. Congreso internacional de Química, Farmacéutico y Biología. Revista Salud Pública y Nutrición. Edición especial 10-2010.

26. Guillén-Garcés, R.A.; Hansen, A.M.; Afferden, M. Mineralization of atrazine in agricultural soil: Inhibition by nitrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 2007. 26, 844-850.

27. Hach Company/Hach Lange GmbH. 1989. Turbidimetric Method 8139.

28. Hall, Tom. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 1999. Vol. 41, p.95-98.

29. Hang, S.; Sereno, R. Adsorción de atrazine y su relación con las características sedimentológicas y el desarrollo del perfil de dos suelos de la provincia de Córdoba. *RIA.* 2002. 31(3): 73-87.

30. Hayes, T., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *PNAS.* 2010. 107(10):4612-4617.

31. Hessler, D.P.; Gorenflo, V.; Frimmel, F.H. Degradation of Aqueous Atrazine and Metazachlor Solutions by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Influence of pH and Herbicide Concentration. *Acta hydrochim. Hydrobiol.* 1993. 4:209-214.

32. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some chemicals that cause tumors (SIC) of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. World Health Organization. Lyon, France. 1999. 73:59-61.

33. Janer, G.; Guitart, R. Steroid levels, steroid metabolic pathways and their modulation by endocrine disruptors in invertebrates. Tesis doctoral Farmacología, Terapéutica y toxicología. Universidad Autónoma de Barcelona. 2005.

34. Johnson, D.; Rolfe, S.; Hallberg K.; Iversen, E. Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ Microbiol.* 2001. 3(10):630-637.

35. Jones, L.R.; Owen, S.A.; Horrell, P.; Burns, R.G. Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. *Wat. Res.* 1998. 32, 2542 - 2549.
36. Karns, J.S. Gene sequence and properties of an s-triazine ring-cleavage enzyme from *Pseudomonas* sp. Strain NRRLB-12227. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999. 65:3512-3517.
37. Katz, I., Dosoretz, C.G., Mandelbaum, R.T., Green, M. Atrazine degradation under denitrifying conditions in continuous culture of *Pseudomonas* ADP. *Wat. Res.* 2001. 35, 3272 - 3275.
38. Krutz, L.J.; Shaner, D.L.; Weaver, M.A.; Webb, R.M.T.; Zablotowicz, R.M.; Reddy K.N.; Huang Y.; Thomson, S.J. Agronomic and environmental implications of enhanced s-triazine degradation, Oest Nabag SCU. 2010. 66, 461-481.
39. Kumar, S.; Masatoshi, N.; Dudley, J.; Tamura, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 2008. Vol.9 n°4, p. 299-306.
40. La Lista de Lista. Red de Acción en Plaguicidas del Reino Unido. 3ª edición. Inglaterra. 2009. Disponible en internet: [http://www.rap-al.org/articulos\\_files/La%20Lista%20de%20Listas.pdf](http://www.rap-al.org/articulos_files/La%20Lista%20de%20Listas.pdf).
41. Langlois, V.; Carew, A.; Pauli, B.; Wade, M.; Cooke, G.; Trudeau, V. Low levels of the Herbicide Atrazine Alter Sex Ratios and Reduce Metamorphic Success in *Rana pipiens* Tadpoles Raised in Outdoor Mesocosms. *Environmental Health Perspectives*. 2010. 118(4):552-7.
42. Loprieno, N.; Barale, R.; Mariani, L.; Sheets, R.F.; Hamilton H.E.; Falaballa, F.; Bonderman, D.P.; Bonatti, S. Results of mutagenicity tests on the herbicide atrazine. *Mutation Research*. 1980. 74(3):250.

43. Mandelbaum, R.T.; Allan, D.L.; Wackett, L.P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 1451 - 1457.
44. Martínez, A.; Pérez A.; Pérez, M. Microbiología y Parasitología Médicas. *Pseudomonas*. Capítulo 29. 2001. Pg. 303-311.
45. Martínez, L. Estudio del comportamiento en el medio ambiente de los herbicidas empleados en el maíz. Asesores: Tadeo, J.; Rodríguez, F. Tesis doctoral. Departamento de protección Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. España. 1996.
46. Martínez, B.; Tomkins, J.; Wackett, L.; Wing, R.; Sadowsky, M. Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Atrazine Catabolic Plasmid Padp-1 from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Journal of Bacteriology*. 2001. 183 (19):5684-5697.
47. Mulbry W. Purification and Characterization of an Inducible s-Triazine Hydrolase from *Thiodococcus corallinus* NRRL B-15444R. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. 60(2):613.
48. National Resources Defense Council (NRDC). EPA Won't Restrict Toxic Herbicide Atrazine, Despite Health Threat. 2003. Disponible en internet: <http://www.nrdc.org/health/atrazine/>.
49. Nakatsu, C.; Ng, J.; Singh, R.; Strain, N.; Wyndham, C. Chlorobenzoate catabolic transposon Tn5271 is a composite class I element with flanking class II insertion sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. 88:8321-8316.
50. Nilanjana, D.; Agitail, E.; Lakshmi, V. Biodegradation of atrazine by *Cryptococcus laurentii* isolated from contaminated agriculture soil. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2012. 2(3):450-457.
51. Orbegoza, J.; Abanto, M.; Garcia, R.; Ramírez, P. Identificación molecular de *Pichia guilliermondii* aislada de aguas ácidas de minas del Perú y su resistencia a metales pesados. *Rev. Perú. Biol.* 2008. 15(1): 91-96.

52. Prospero, J.M.; Blades, E.; Mathison, G.; Naidu, R. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*. 2005. 21, 1-9.
53. Radosevich, M.; Traina, S.J.; Hao, Y.L.; Touvinen, O.H. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. 61(1):297-302.
54. Ralebitso, T.; Senior, E.; Van Verseveld, H. Microbial Aspects of Atrazine Degradation in Natural Environments, *Biodegradation*. 2002. 13(1), pp.11-19.
55. Red de Acción en Plaguicidas y sus alternativas para América Latina (RAPAL). Agrotóxicos usados en Uruguay y prohibidos o rigurosamente restringidos en la Unión Europea. 2009. Disponible en internet: <[http://www.rapaluruguay.org/agrotoxicos/Prensa/Trabajo\\_lista\\_agro\\_031209.pdf](http://www.rapaluruguay.org/agrotoxicos/Prensa/Trabajo_lista_agro_031209.pdf)>.
56. Seffernick, J.L.; Tavish, H.M.; Osborne, J.P.; Souza, M.L.; Sadowsky, M.J.; Wackett, L.P. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. Strain ADP is a metalloenzyme. *Biochemistry*. 2002. 41:14430-14437.
57. Sexena, P.K.; Mani, K. Quantitative study of testicular recrudescence in the fresh water teleost, *Channa punctatus* (Bl.) exposed of pesticides. *Bull. Environ Cont. Toxicol.* 1985. 34:597-607.
58. Shapir, N.; Goux, S.; Mandelbaum, R.; Pussemier, L. The potential of soil microorganisms to mineralize atrazine as predicted by MCH-PCR followed by nested PCR. *Can.J.Microbiol.* 2000. Vol. 46:425-432.
59. Shapir, N.; Rosendahl, C.; Johnson, G.; Andreina, M.; Sadowsky, M.J.; Wackett, L.P. Substrate specificity and colorimetric assay for recombinant TrzN derived from *Arthrobacter aurescens* TC1. *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71(5);2214-20. PMID: 15870302.



60. Shapir, N.; Mongodin, E.F.; Sadowsky, M.J.; Daugherty, S.C.; Nelson, K.E.; Wackett, L.P. Evolution of Catabolic Pathways: Genomic Insights into Microbial s-Triazine Metabolism. Minireview. *Journal of Bacteriology*. 2007. 189(3):674-682.
61. Siegrist J. *Pseudomonas Media and Test*. Sigma-Aldrich. Analytix Volume 2007 Article 5.
62. Singh, P.; Suri, C.R.; Cameotra, S.S. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 2004. 317, 697 - 702.
63. Schipper, E.F.; Bergevoet, A.J.H.; Kooyman, R.P.H.; Greve, J. New detection method for atrazine pesticides with the optical waveguide Mach-Zehnder immunosensor. *Analytica Chemical Acta* 341. 1997. 171-176.
64. Smith, D.; Alvey, S.; Crowley, D.E. Cooperative catabolic pathways within an atrazinedegrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. 53, 265 - 273.
65. Sorensen, S.J.; Bailey, M.; Hansen, L.H.; Kroer, N.; Wuertz, S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature*. 2005. 3, 700-710.
66. Struthers, J.K.; Jayachandran, K.; Moorman, T.B. Biodegradation of Atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and Use of This Strain in Bioremediation of Contaminated Soil. *Appl Environ Microbio.* Sep 1998. 64(9), 3368-3375.
67. Tafoya, T. Biodegradación del herbicida triazínico, atrazina, por una comunidad bacteriana, seleccionada en quimiostato, inmovilizada en reactores de lecho empacado. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México. 2008. Disponible en internet: <<http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace /simple-search?query=atrazina>>.
68. Thompson, J.; Gibson, T.; Pleioniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. The Clustal\_X interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res.* 1997. 25:4876-4882.

69. Tomasek, P.H.; Frantz, B.; Sangodkar, U.M.X.; Haugland, R.A.; Chakrabarty, M. Characterization and nucleotide sequence determination of a repeat element isolated from a 2,4,5-T degrading strain of *Pseudomonas cepacia*. *Gene*. 1989. 76:227-238.
70. Topp, E.; Mulbry, W.M.; Zhu, H.; Nour, S.M.; Cuppels, D. Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(8);3134-41. PMID: 10919761.
71. Vaishampayan, P.A.; Kanekar, P.P.; Dhakephalkar, P.K. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. Strain MCM B-436, an atrazine degrading bacterium, from rhizospheric soil. *Internat. Biodet. Biodeg.* 2007. 60, 273-278.
72. Wang, J.H.; Zhu, L.S.; Liu, A.J.; Ma, T.T.; Wang, Q.; Xie, H.; Wang, J.; Jiang, T.; Zhao, R.S. Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp. strain HB-5 that transforms atrazine. *Environ. Geochem. Health.* 2011. **33**(3):259-266. [doi:10.1007/s10653-010-9337-3].

## **ANEXO 01**

### **Medio de cultivo MS (De Souza, 1998)**

Atrazina 100 mg/L

$K_2HPO_4$  10 Mm

$NaH_2PO_4$  3 Mm

$MgSO_4$  1 mM

Solución STOCK 10 mL

### **Solución STOCK para 100 mL.**

$CaCl_2$  163 mg/L ----- 0.0163 gr

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$  200 mg/L ----- 0.02 gr

$MnSO_4 \cdot H_2O$  20 mg/L ----- 0.002 gr

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  10 mg/L ----- 0.001 gr

$CuSO_4$  20 mg/L ----- 0.002 gr

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$  8.5 mg/L ----- 0.00085 gr

$H_3BO_3$  2 mg/L ----- 0.0002 gr

## **ANEXO 02**

### **Aislamiento de ADN genómico de bacterias con el sistema Wizard® DNA Purification Kit.-modificado**

Materiales para ser aportados por el usuario:

- Tubos microcentrífuga de 1.5 mL.
- Agua de baño, 80°C
- Agua de baño, 37°C
- Isopropanol, a temperatura ambiente
- Etanol a 70%, a temperatura ambiente
- Agua de baño, 65°C (opcional; para rápida rehidratación del ADN)
- 50 mM EDTA (pH 8.0) (Para bacterias Gram positivas)
- 10 mg/mL lisozima (Sigma Cat.# L7651) (Para bacterias Gram positivas)
- 10 mg/mL lysostaphin (Sigma Cat.# L7386) (Para bacterias Gram positivas)

#### **Protocolo de extracción**

1. Agregar 1 mL del cultivo en 1.5 mL de tubo micro centrífuga
2. Centrifugar en 13,000–16,000  $\times g$  por 2 minutos para precipitar las células. Remover el sobrenadante. Para Bacteria Gram positiva, proceder con el paso 3.

#### **Para bacterias Gram negativas ir directamente al paso 6.**

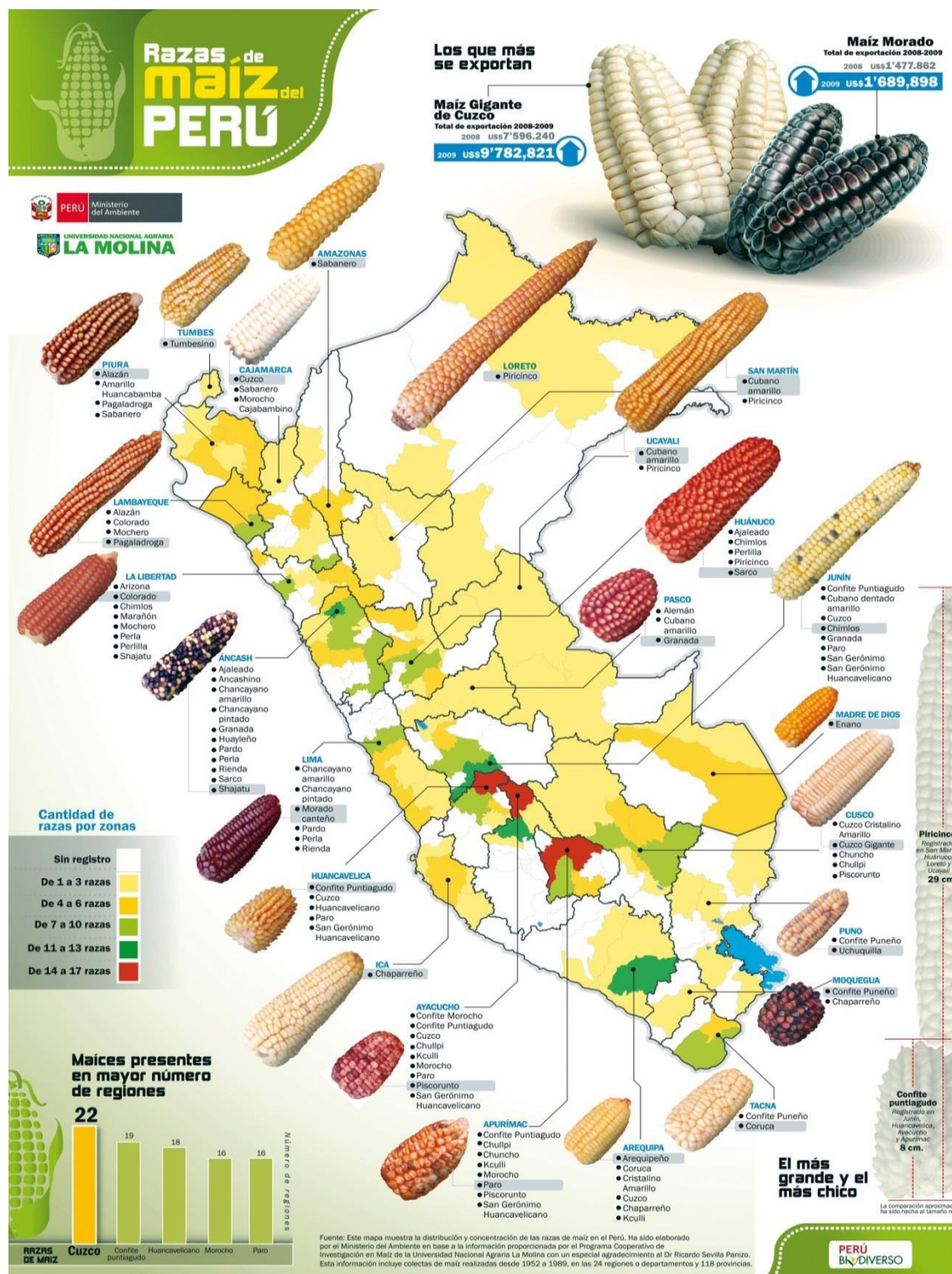
3. Completamente resuspender las células en 480  $\mu$ L de 50 mM EDTA
4. Agregar apropiadamente la enzima lítica, luego resuspender las células en un total de 120  $\mu$ L, y pipetiar suavemente la mezcla. El propósito de este tratamiento es romper la pared celular para tener una eficiente lisis celular.

**Nota:** Para ciertas especies de *Staphylococcus*, una mezcla de 60  $\mu\text{L}$  de 10 mg/mL lisozima y 60  $\mu\text{L}$  de 10 mg/mL lysostaphin es requerido para una eficiente lisis. Sin embargo, muchas cepas Gram positivas (e.g., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, y *Brevibacterium albidum*) lisa eficientemente usando solo lisozima.

5. Incubar la muestra a 37°C por 30–60 minutos. Centrifugar por 2 minutos en 13,000–16,000  $\times g$  y remover el sobrenadante.
6. Agregar 600  $\mu\text{L}$  de solución de lisis nuclear. Suavemente pipetear hasta que las células estén resuspendidas.
7. Incubar a 80°C por 5 minutos para lisar las células; enfriar a temperatura ambiente.
8. Agregar 3  $\mu\text{L}$  de RNase Solución para lisar células. Invert the tube 2–5 times to mix.
9. Incubar a 37°C por 15–60 minutos. Cool the sample to room temperature.
10. Agregar 200 $\mu\text{L}$  de Solución precipitadora de proteínas para tratar con RNasa las células lisadas. Vorteciar vigorosamente a alta rapidez por 20 segundos para mezclar la Solución de Precipitación de Proteínas con las células lisadas.
11. Incubar la muestra sobre hielo por 5 minutos.
12. Centrifugar a 13,000–16,000  $\times g$  por 3 minutos.
13. Transferir el sobrenadante conteniendo ADN a un tubo limpio microcentrífuga de 1.5ml, conteniendo 600 $\mu\text{L}$  isopropanol a temperatura ambiente.
14. Suavemente mezclar por inversion hasta observarse como las hebras del DNA una masa de forma visible.
15. Centrifugar a 13,000–16,000  $\times g$  por 2 minutos.
16. Cuidadosamente retirar el sobrenadante y drenar el tubo sobre un limpio papel absorbent. Agregar 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a temperature ambiente y suavemente invertir el tubo por varios tiempos para lavar el ADN precipitado.
17. Centrifugar en 13,000–16,000  $\times g$  por 2 minutos. Cuidadosamente aspirar el etanol con papel absorbente.

## ANEXO 03

Mapa de razas de maíz del Perú obtenido del Sistema Nacional de Información Ambiental (SINIA – MINAM).





#### ANEXO 04.

Sustancias clasificadas por la Comisión Europea como prioritario y su capacidad para ser un disruptor endocrino (Janer *et al.*, 2005)

Pesticides				Industrial compounds			
Production Persistence Category <sup>1</sup> Group <sup>2</sup>				Production Persistence Category Group			
Chlordane	*	1	I	Nitrofen	*	1	II
Mirex	*	1	I	Endosulfan	*	2	II
Toxaphene	*	1	I	Aldrin	*	2	II
Maneb	*	1	I	Endrin	*	2	II
Metam Natrium	*	1	I	Heptachlor	*	2	II
Thiram	*	1	I	Carbendazim	*	2	II
Zineb	*	1	I	Prochloraz	*	2	II
Lindane	*	1	I	Iprodione	*	2	II
Linuron	*	1	I	Ziram	*	2	II
Atrazine	*	1	I	Diuron	*	2	II
Alachlor	*	1	I	Diazinon	*	2	II
Kepona	*	2	I	Dimethoate	*	2	II
DDT	*	2	I	Malathion	*	2	II
Vinclozolin	*	2	I	Parathion	*	2	II
Dieldrin	*	1	II	Simazine	*	2	II
2,4-D	*	1	II	Triadimefon	*	2	II
Dicofol	*	1	II	Bromomethane	*	2	II
Aminotriazol	*	1	II	Propanil	*	2	II
Styrene	*	1	I				
HCB	*	1	I				
Bisphenol A	*	1	I				
Organotins	*	1	I				
3,4-Dichloroaniline	*	1	I				
Resorcinol	*	1	I				
Dioxins	*	1	I				
Alkylphenols	*	1	II				
PCBs	*	1,2	I,II				
PBBs	*	1,2	I,II				
Furans	*	1,2	I,II				
Phthalates	*	1,2	I,II				
Chlorophenols	*	2	II				
o-phenylphenol	*	2	II				
Carbon disulphide	*	2	II				
Perchloroethylene	*	2	II				

<sup>1</sup>Category 1: evidence of endocrine disruption in an intact organism. Category 2: potential for endocrine disruption (in vitro evidences, in vivo effects that may, or may not, be ED-mediated, structural analyses).

<sup>2</sup>Group 1: Category 1 + high concern in terms of human and wildlife exposure. Group 2: Category 1 + medium concern in terms of human and wildlife exposure; or Category 2. Both, groups 1 and 2 contained only substances highly persistent and/or high production volume.

## ANEXO 05

Lista de los herbicidas triazínicos importados y registrados por el SENASA.



Sistema Integrado de Gestión de Insumos Agrícolas - SIGIA

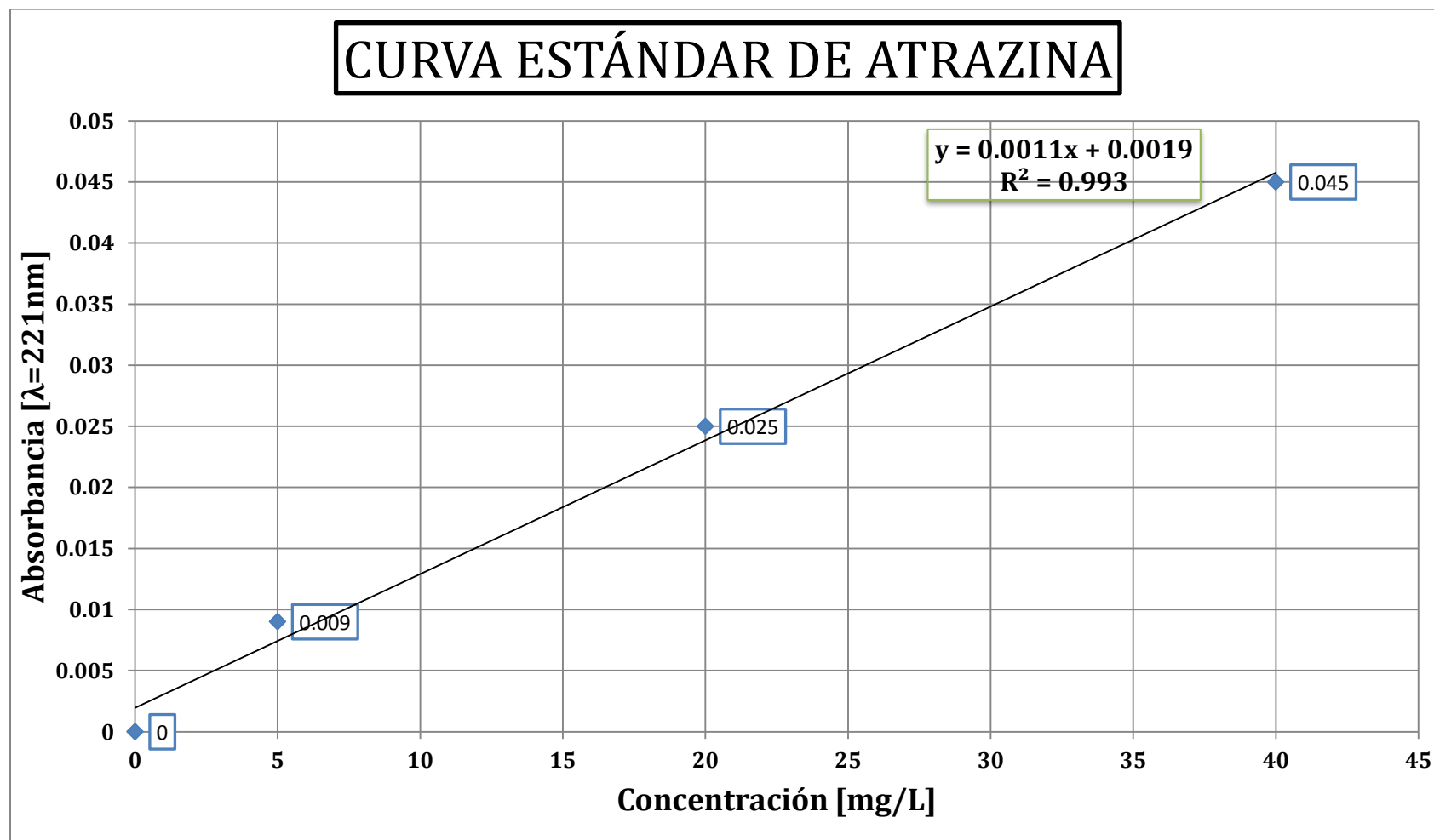
### Reporte de Productos Plaguicidas Registrados

Nombre Comercial	Titular del Registro	Nro de Registro	Ingrediente Activo	Clase	Tipo Formulación
ATRAMET COMBI 50 SC	MAKHTESHIM AGAN PERU S.	287-98-AG-SENASA	AMETRYN, ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
ATRAMET COMBI 80 WP	MAKHTESHIM AGAN PERU S.	887-98-AG-SENASA	AMETRYN, ATRAZINE	Herbicida	Pólvo mojable
ATRALEX 50 SC	MAKHTESHIM AGAN PERU S.	288-97-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
ATRALEX 80 WP	MAKHTESHIM AGAN PERU S.	889-98-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Pólvo mojable
ATRASIN 500 FW	TECNOLOGIA QUIMICA Y	PQUA N° 304-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
ATRIDAS 500 SC	QUIMICA SUIZA S.A	PQUA N° 373 - SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
CAÑERO SUPER 500 SC	BAYER S.A	285-98-AG-SENASA	AMETRYN, ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
ESCARDA 500 SC	ARIS INDUSTRIAL S.A.	877-99-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
FARMETRIN COMBI	FARMEX S.A.	819-99-AG-SENASA	AMETRYN, ATRAZINE	Herbicida	Pólvo mojable
FARMETRIN COMBI 500 SC	FARMEX S.A.	PQUA N° 189-SENASA	AMETRYN, ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
FARMEZIN 500 SC	FARMEX S.A.	PQUA N° 149-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
FARMEZIN 80	FARMEX S.A.	903-99-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Pólvo mojable
FLOZINA 500 F	TECNOLOGIA QUIMICA Y	386-97-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
GENIUS 80 PM	HERRERA & MENDOZA S.A.	282-98-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Pólvo mojable
GESAPAX COMBI 500 FW	SYNGENTA CROP	582-98-AG-SENASA	AMETRYN, ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
GESAPRIM 90 WG	SYNGENTA CROP	384-97-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Gránulos dispersables
MAICERO 500 SC	BAYER S.A	870-98-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
MAICERO 80 PM	BAYER S.A	871-98-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Pólvo mojable
RANGER FLASH 500 FW	FARMAGRO S.A	782-98-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
RANGER FLASH 80 WP	FARMAGRO S.A	754-98-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Pólvo mojable
RAYO 500 FW	NEO AGRUM S.A.C.	153-98-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
SANTRAZINA	ARIS INDUSTRIAL S.A.	942-2000-AG-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada
ULTRAPRIM	DROKASA PERU S.A	PQUA N° 141-SENASA	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada



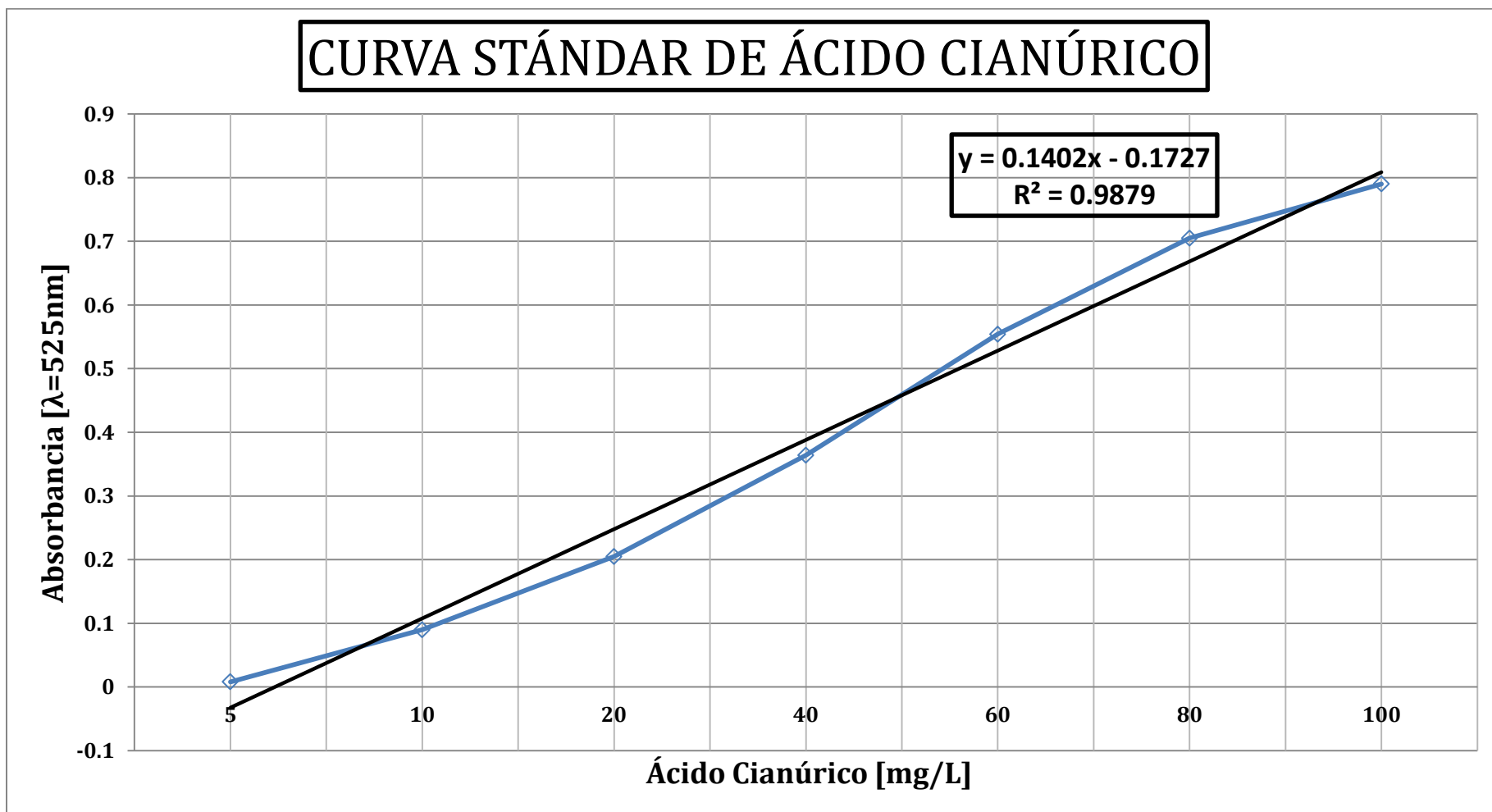
## ANEXO 06.

Curva estándar de atrazina.



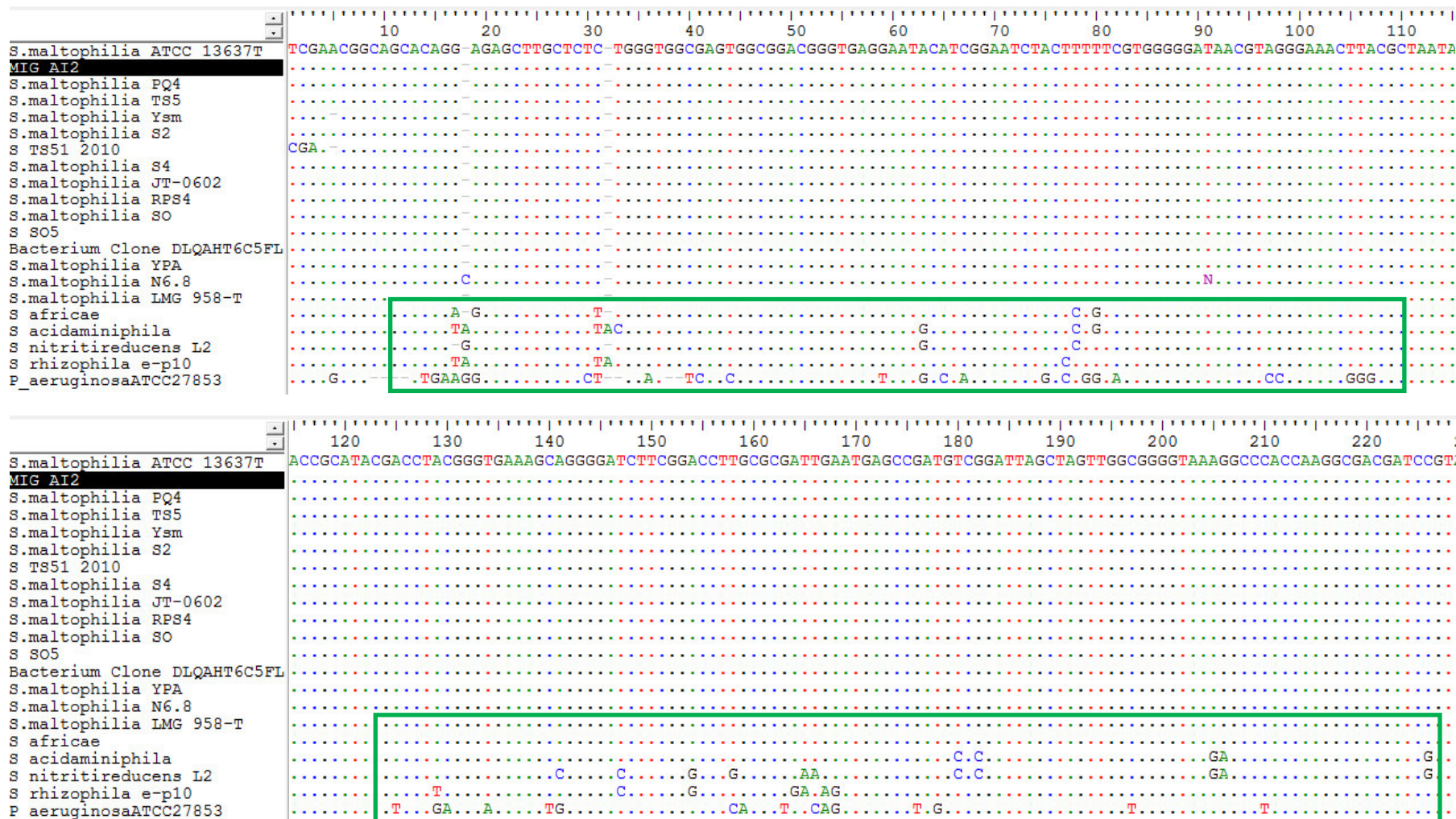
## ANEXO 07.

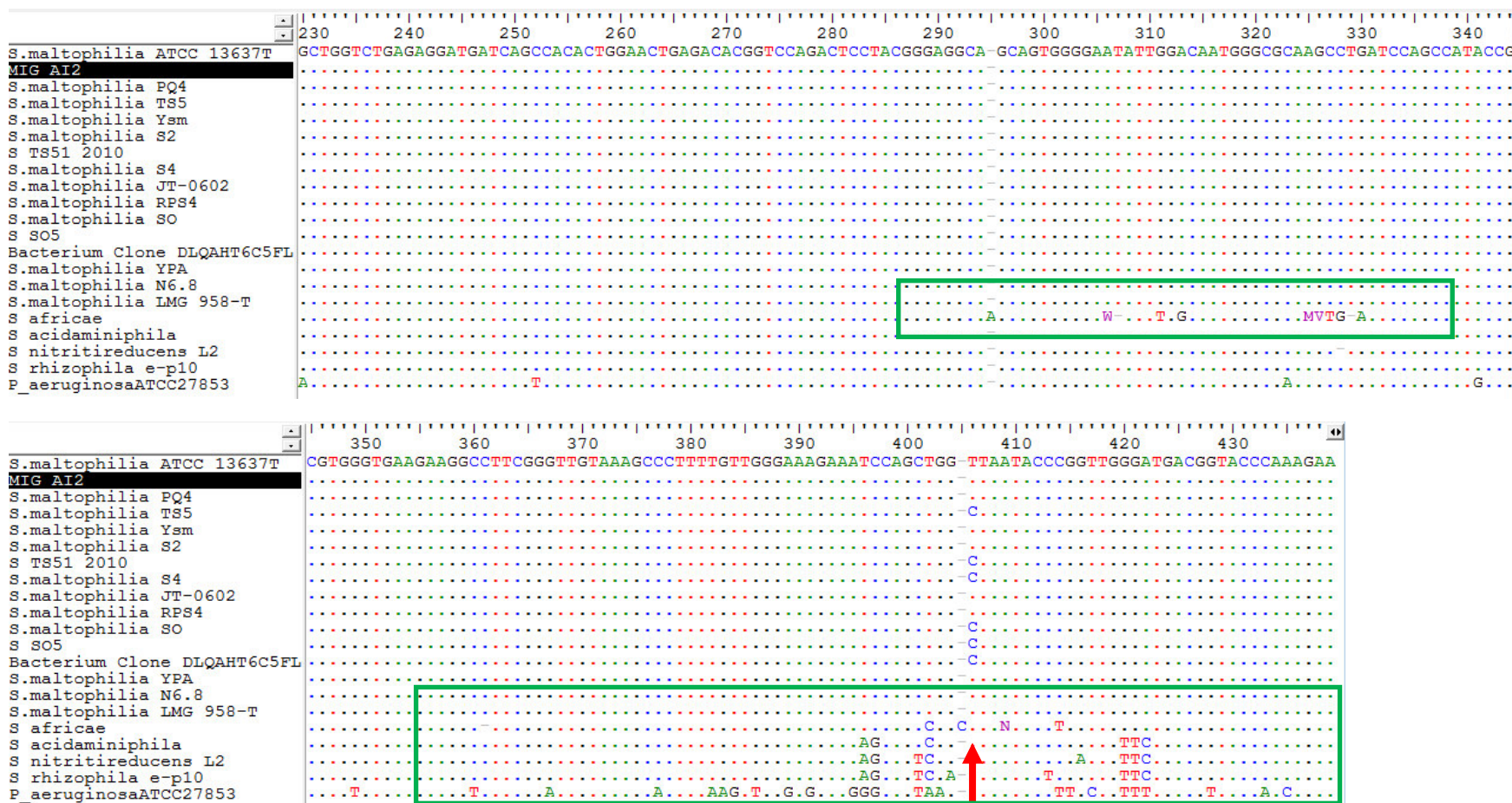
Curva estándar de ácido cianúrico.



## ANEXO 08.

### Alineamiento del gen rRNA 16S de MIG AI 2





Alineamiento múltiple realizado con el programa ClustalW y editado en BioEdit version 7.0.9. En la posición 406 (Flecha roja) única diferencia entre las especies *maltophilia*. Las secuencias presentan regiones conservadas a diferencia del grupo externo *P. aeruginosa* ATCC 27853, y las otras especies del género *Stenotrophomonas* sp. En cuadrado verde se muestran las regiones polimórficas de las especies.



